

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM:
DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E
INTERFERENCIA CON EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Julio Álvarez Sánchez

Bajo la dirección de los doctores
Víctor Briones Dieste y Ana Mateos García

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-0994-3**

©Julio Álvarez Sánchez, 2008



TESIS DOCTORAL



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**COMPLEJO *Mycobacterium avium*:
DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
E INTERFERENCIA CON EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS**

JULIO ÁLVAREZ SÁNCHEZ

MADRID 2008



Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense
Madrid

Complejo *Mycobacterium avium*:
Diagnóstico, Caracterización Molecular
e Interferencia con el Diagnóstico de la
Tuberculosis

Julio Álvarez Sánchez

Memoria presentada para optar al Título de Doctor por la
Universidad Complutense



Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense
Madrid

D. Víctor Briones Dieste y Dña. Ana Mateos García, Profesores Titulares del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense, y Dña. Alicia Aranaz Martín, Contratada Doctor por la Universidad Complutense

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Complejo *Mycobacterium avium*: diagnóstico, caracterización molecular e interferencia en el diagnóstico de la tuberculosis”** ha sido realizada por el licenciado en veterinaria D. Julio Álvarez Sánchez en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Fdo. A. Aranaz

Fdo. V. Briones

Fdo. A. Mateos

A Mis Padres

A mi Abuelo, aunque no me haya esperado

*Ahora necesito más que nunca
mirar al cielo. Ya sin fe y sin nadie,
tras este seco mediodía, alzo
los ojos. Y es la misma verdad de antes,
aunque el testigo sea distinto. Riesgos
de una aventura sin leyendas ni ángeles,
ni siquiera ese azul que hay en mi patria.
Vale dinero respirar el aire,
alzar los ojos, ver sin recompensa,
aceptar una gracia que no cabe
en los sentidos pero les da nueva
salud, los aligera y puebla. Vale
por mi amor este don, esta hermosura
que no merezco ni merece nadie.
Hoy necesito el cielo más que nunca.
No que me salve, sí que me acompañe.*

Claudio Rodríguez

Qué cosa fuera la maza sin cantera

Silvio Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

La verdad es que después de tanto tiempo soñando con que llegara este momento (el de finalizar la tesis doctoral, y con ello dar por concluida una etapa más de la vida), al hacer balance de estos años me doy cuenta de que este apartado debería ser tan largo como la tesis en sí, ya que es mucho lo que tengo que agradecer.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis la ayuda que me han prestado en todo este tiempo. Quisiera darle las gracias a Alicia, por haberme sabido guiar, escuchar y hacerme sentir apoyado y comprendido; sé que no soy una persona fácil en ocasiones, Ali, y te agradezco que nunca hayas perdido la paciencia conmigo. Te debo mucho más de lo que te crees. A Víctor y Ana (la persona que me dio la oportunidad de integrarme en este grupo de investigación), por su esfuerzo tan diligente en la lectura y corrección de este manuscrito, en unas condiciones a veces complicadas, y por su apoyo incondicional. Muchas gracias de todo corazón a los tres.

Gracias a Lucas por sus sabios consejos y su dirección, por haber sido un maestro paciente e irónico, por haberme dado algún toquecillo aleccionador cuando mi carácter diletante se adueñaba de mis actos, por haber estado siempre dispuesto a discutir mis ideas (la mayoría de las veces incluso escuchándolas), por haberme permitido aprender tanto. En muchos sentidos has sido el estímulo que necesitaba para no detenerme y seguir adelante, y nuestras discusiones han sido para mí una fuente de motivación.

Muchas gracias a todos los que han estado conmigo en el grupo de micobacterias, que era pequeñito al comienzo y que ahora ha crecido tanto. Gracias a Lucía y a Natalia, las dos personas que tuvieron que cargar con un recién licenciado torpón y cabezota. A Lucía, que ha sido sin duda el ejemplo más cercano de que la dedicación al trabajo y la constancia al final dan sus frutos (al final, eso sí) y que me enseñó de todo, desde a usar el excell a redactar un informe. De verdad que todo el tiempo que me has dedicado no ha caído en saco roto, y te lo agradezco de corazón. Y gracias a Natalia, que tuvo que desasnarme en el laboratorio (con su particular ironía y su inagotable paciencia) y que es la persona que conozco más capaz de hacer fácil lo difícil. Muchas gracias, maestra, y espero que nos sigamos tomando cafés aunque sea de mucho en mucho.

Gracias a mis compis en primera línea de batalla, Bea y Javi. Muchas gracias, tía Bea, por tantas y tantas cosas... que si me pusiera a detallarlas aquí estos agradecimientos tendrían mil páginas (entre ellas ordenarme la mesa y la cabeza de vez en cuando). Ha sido una auténtica

suerte encontrarte, y un auténtico honor ser tu compañero de trabajo, y espero que me dejes ser tu compi muchos años más (si tu paciencia te lo permite; a lo mejor ya la he puesto a prueba demasiadas veces). Uno de los motivos por los que más ganas tenía de terminar este trabajo era para poder pagar por fin la deuda de la dedicatoria pendiente (¡ahora te toca a ti!). Gracias a Javichu... ¡¡qué te voy a decir a estas alturas!! Pues que muchas gracias por haber compartido conmigo estos años, amigo, dentro y fuera del laboratorio, con sus ratos mejores y peores, cultivando micobacterias a 50°C (¡flamea!), sujetando cabras o viajando a mataderos por la geografía española, y hablando de mujeres, fútbol o música, como hacen los hombres. Has alegrado mucho mi vida de becario, tío, y te lo agradezco de veras.

Gracias a los que han ido viniendo detrás y han ido ocupando la trinchera, lo que me ha permitido irme acercando a la finalización de la tesis. Gracias a Fran por tener siempre la cabeza fría, organizar de forma tan eficiente el laboratorio, aguantar mis tonterías en el despacho (¡de verdad que siempre digo chorradas por alegraros el día, no por fastidiároslo!) y por demostrarme que aún quedan atléticos de corazón. Gracias a Cristina, Elena, Nuria Moya, Sabrina, Nuria Álvarez, Tatiana y Fernando por haberme ayudado siempre que lo he necesitado sin poner nunca ningún problema, siempre con el sí incondicional a punto. Estoy muy contento de haber podido trabajar con vosotros estos años, y espero que sintáis esta tesis como vuestra, porque os la debo en gran medida.

Gracias a los demás compañeros de Visavet. Gracias a Pepelu, típico vet, admirador incondicional de Marconato, por ser el tío más cachondo que conozco, por hacerme reír incluso cuando no me apetece, por estar totalmente chalado pero al mismo tiempo dar los mejores consejos. Gracias por alegrarme los días más grises, tío, por estar siempre ahí con la sonrisa dispuesta, por ser tan malo jugando al colin y por haber traído al mundo a los kitchengarden. No te perdono que te hayas ido... a menos que sigas viniendo a las fiestas. Gracias a Nerea, siempre dispuesta a reírse de cualquier chiste (¡de verdad que para un payaso como yo eso es muy reconfortante!) y siempre dispuesta a compartir cualquier carga, con la sonrisa siempre a punto, llena de ilusión; mis duetos contigo son lo más productivo que he hecho muchos días en Visavet, y lo que más me ha alegrado, y no olvidaré que gracias a ti he podido usar material de escalada de Vekavel (los dos sabemos que era una espinita que tenía clavada). Gracias a Sergio, el imperturbable informático que esconde un corazón debajo de sus marcados abdominales (bueno, algo más arriba), por haber compartido tantos momentos buenos y malos, por escuchar siempre, por hablar a veces (muy de vez en cuando, pero enunciando teorías dignas de ser escuchadas). Gracias también por tu ayuda con la parte de diseño de la tesis (¡has conseguido que al menos

desde fuera parezca bonita!) A poco que condujeras mejor y mejoraras un poco al PES y al pádel serías casi perfecto, tío. Muchas gracias por haberme dejado conocerte, aunque fuera después de unos años. Y gracias a Joaquín, que por estar dispuesto a compartir sus discos, empezando por Pink Floyd (¡te prometo que yo no te he perdido ninguno!) se ha acabado convirtiendo en mi camello musical. Gracias por presentarme a Perry (¡sobre todo por Perry!), Durruti Column, Dead Can Dance, Max Richter, Sigur Ros, los hermanos globeros y muchos más, que me han acompañado tantos y tantos días de curro (y fuera del curro). Gracias por tener tu puerta siempre abierta, para una cerveza o para aguantar las quejas de todo el mundo (de dónde sacarás la paciencia...), por estar siempre dispuesto a lo que sea por ayudar. Eres un tío muy especial, joaco, me alegro mucho de haber tenido la oportunidad de conocerte, y de poder ser tu amigo.

Gracias a todos los compis visavetianos que han alegrado mis cafés mañaneros y mis comidas: a Pili (y a su risa inagotable), a Jose (¡cebo, ya van muchos años aguantándonos a pie de cañón!), a Laura de las Heras – Raquel del Rosario, organizadora infatigable (y eficientísima) de eventos visavetianos, a María Macetillas, por ser tan entrañable, a Soniqui (también dispuesta siempre a echar un cable con lo que sea, y con la que me quedan muchas conversaciones pendientes, espero; ¡eres única, a ver si te das cuenta!), a Marta (por sufrirme sin quejarse, aunque sea un tiranuelo, por contagiar su buen humor, por sus ganas de aprender y sus ganas de ayudar, y por su buen humor provinciano y su paciencia con tanto paleta de la capital), a Tania (por su risa contagiosa), a los bioseguros (David, por permitirme hacerle el ataque del bíceps mantequilloso sin tomar represalias; las Lauras y Pedro, por velar por nuestra seguridad... ¡espero!).

Gracias también a los que se han ido por haberme permitido conocerlos, y pasar muy buenos ratos (Maguis, Gemota, Quique, Delia, Bea Tames, Ana Mata, Cristina Ballesteros, Tarik...). Gracias a Marga por ser tan cachonda, por dejarse engañar de vez en cuando con paciencia maternal, por dejar que le grape los papeles y por aguantar con paciencia infinita mis “¿sabes si viene luego Lucas?”. A Laura Torres, básicamente porque le toca aguantar lo mismo. Gracias a Arancha y a Carmen, por haber sido unas compañeras estupendas durante todo este tiempo, por sonreír todos y cada uno de los días en los que me he cruzado por los pasillos con ellas (durante 6 años ya), por no darme nunca un escobazo a pesar de que ande siempre en medio, pise los suelos en el peor momento, me deje la tarjeta en todos lados y tenga mi sitio como una leonera a la que no se puede uno acercar.

Gracias a todos los demás compañeros con los que he compartido estos años en visavet; al grupo de VE, con más gente que una división de infantería; gracias a María, Isa ¡(que te vaya muy bien!), Fanny, Mari Carmen (por no enfadarse cuando me meto con ella por estar tanto tiempo en el vestuario) y a todas las demás. Gracias a Concha, Anabel y Tiru, y a los últimos que han ido llegando (Vero, Lucía, Leydis...).

Quisiera también agradecer a todos los que desde fuera del laboratorio me han ayudado durante este tiempo. Gracias a los compañeros del difunto Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y de todas las administraciones públicas con los que he tenido la oportunidad de trabajar, por su ayuda y su apoyo. Gracias en especial a Jose Luis Saéz (que mantiene todos los registros existentes de tuberculosis en su cabeza) y a Paco Reviriego, por haber tenido paciencia con este neófito en todo lo relativo a legislación, reales decretos, directivas y demás palabros. Gracias a Matt por echarme una mano con la lengua del Imperio (te debo una cerveza tamaño escocés).

Gracias a toda la gente que he conocido en otros laboratorios del mundo en el transcurso de mi beca. Gracias a Milan Bartos (por todas sus inolvidables lecciones), Monika Moravkova, Ivo Trcka y Vladimir Beran por hacerme ver que la República Checa es un país frío pero muy cálido, y a Davide (Il Vitellone) por compartir tantos buenos momentos allí ¡(eres de lo mejor que he encontrado!); a Linda Mann y Barbara Brown-Elliott por ayudarme en mi inmersión en la América tejana profunda (pero que muy profunda); a Barry ¡(¡Baz!); Nathan Jardine y Nishel Florisson por hacerme ver que si Australia es la tierra prometida, WA es sin duda el mejor rincón de ella; y a Christinne Turenne, David Alexander, Michael Reed, Pilar Domenech y Frederic Veryer (Fred-Frank) por hacer de mi paso por Montreal una experiencia inolvidable (incluso aunque no hubiera experimentado lo que es una tormenta de hielo). Gracias a los jefes que he tenido en cada una de mis estancias (Ivo Pavlik, Richard Wallace, Debby Cousins y Marcel Behr) por haberme permitido trabajar con ellos, porque he aprendido muchas cosas (entre ellas, que en todas partes cuecen habas). Aunque ninguno de ellos llegue a leer estos agradecimientos, los llevo en el corazón, y han contribuido a que sienta que el camino que elegí al terminar la carrera fue un gran acierto. Gracias también a la gente de Venomyc que he conocido durante mi periodo de becario, y con los que he podido intercambiar ideas. Gracias en especial a Alastair Greig y a Douwe Bakker, porque fueron los primeros que me ayudaron a decir más de dos palabras en inglés sin ponerme colorado en una reunión.

Y ya fuera del ámbito laboral, quisiera agradecer a todos los que me han aguantado en el día a día su apoyo y su compañía. Gracias a los amiguetes de la facultad; a Miguel ¡(gracias por esos

1:59:22!) Alex, Jaimi, Edu (isoriata!), Simona, Raquel, Fede. A los que, por cosas de la vida, voy viendo menos, pero sigo queriendo igual; a Elena (jireina de N.I.), Luigi, Cesáreo (bueno, César), Anica. Gracias por todas las horas que hemos pasado juntos, por los viajes, las cervezas, los copazos, las charlas... gracias por todo, de verdad. Espero poder contar con vosotros siempre.

Gracias a la quinta del buitre del Príncipe de Asturias que aún tiene la mala suerte de aguantarme de vez en cuando, a pesar de los años que han pasado. Gracias a Fabio (Chuzodart) y a Gonzalo, ilustres doctores ya, y a Hueso, Parra, Puro, Fer, Benja, Ángela, Bea, Idi... por todas las partidas de dardos (en las que tenéis que rendiros al poderío del kakainho), por los banquetes y los partidillos, y por todo lo demás. Aunque pasen los años y cada vez os pongáis más viejos mientras que yo estoy cada vez mejor, os seguiré queriendo igual.

Gracias a los que me han hecho llevaderos estos años cada vez que he estado solo, en la madre patria o en otras patrias; a Nacho Vegas, Joseph Conrad, Prince, D.H. Lawrence, Vargas Llosa, Silvio Rodríguez, Ignacio Aldecoa, Perry Blake, Cernuda, Sabina, Claudio Rodríguez, Stars of the Lid, John Steinbeck y tantos otros, por convertir muchas horas de paseos o descanso en inolvidables. Gracias a Brno, Tyler, Perth, Montreal y Madrid por permitirme encontrar un sitio en ellas. Sobre todo, gracias a Madrid.

Ya terminando esta lista, gracias a mi familia por cuidar de mí. Gracias a mis tíos (Marilina, Toño, Julio y Asun) por haber estado ahí, por haberme permitido siempre escaparme con ellos unos días cuando estaba harto de Madrid, por cuidar de mi vista, por soportarme. Gracias a mis primos, a Xiana (que dentro de nada estará escribiendo unos agradecimientos como estos), a Guille, para que siga esperando a que llegue la batalla final, a Lucía y Inés, por soportar a su primo aunque ya sean más maduras que él.

Gracias a la niña, que de un modo u otro ha estado presente en mi vida cada uno de los días de los últimos 10 años de mi vida, y que está en todas las ideas que se me han ocurrido, y en todas las páginas que he escrito en este periodo. Gracias por seguir ahí aunque no haya sido capaz de demostrarle aún todo lo que significa para mí. Gracias por todo, y a pesar de todo. Te debo muchas sonrisas todavía, y espero poder pagártelas como sea si me dejas.

Por último, gracias muy especiales a las personas que sé que me sostendrán siempre, que hacen que me sienta capaz de dar saltos mortales (metafóricos) porque sé que serán mi red. Gracias a Sergio, aunque no me dejará ver Batman, por haber sido mi referente, mi modelo, por ser el mejor hermano posible, por intentar siempre ayudarme, protegerme e incluso a veces percibir mi presencia y escucharme (y regalarme ropa de mi talla de vez en cuando). Gracias a

Marta por soportar a su cuñado cansino, un poco bocazas y de visitas intempestivas. Gracias a Elsa y a Martina, por ayudarme a entender que todo sigue, y que la vida sigue su curso aunque nosotros nos tomemos unas vacaciones, así que no merece la pena preocuparse tanto por todo.

En el otro extremo de la película, gracias a mis abuelos por haberme enseñado tantas cosas. En especial gracias a Dionisio, el Abuelo, por haber sido el mejor abuelo con el que cualquier nieto podría soñar; gracias por los partidos de fútbol, por los paseos interminables, por las partidas de chinchón, por reírte siempre de todo... gracias por enseñarme tanto de la vida, Jefe. Ojalá pudieras estar aquí todavía, porque te echo de menos todos los días. Solo espero que allí donde pares estés orgulloso de mí, porque yo siempre lo estaré de ti.

Y ya para finalizar, gracias a mis padres, porque les debo absolutamente todo. A pesar de que en cierto modo me hayan condenado a ser un triste (o un lamentos) toda la vida, porque "haber tenido una infancia feliz es un serio obstáculo para el resto de la vida. Sólo se puede ir a peor". Como dice Savater, "Quien no ha tenido la suerte de recibir del destino unos padres así no puede llegar a saber la inmensa fuerza que dan, la fiera y desafiante confianza que inspiran, el alegre ímpetu que transmiten. Como todo, esta bendición no carece de contraindicaciones: para siempre fomenta la ingenua convicción de que lo real nunca nos será por completo desfavorable, de que jamás faltará tierra bajo nuestros pies cuando haya que danzar, correr o dar el salto. Ilusiones a veces fatales, pero de las que no hay desengaño que nos despierte; aunque todavía más fatal es carecer de ilusiones. Creísteis en mí, en la fuerza que había en mí; mejor dicho, en mí llegó a haber cierta fuerza porque vosotros me convencisteis de que creíais en ella. Os enfrentabais con mis rebeliones, pero nunca me desalentabais. Recibí aliento hasta de vuestras menos razonables intransigencias. De modo que os debo radicalmente mi alegría; porque nadie, ni la muerte futura y ya presente, puede debilitar la alegría de quien se ha sabido de veras amado -no mimado, no adulado- por sus padres, de quien ha notado crecer su inteligencia en inteligencia con ellos. Cuando las cosas han comenzado tan estupendamente, nada sabrá nunca ya ir mal del todo. Aún sigo rodando, gozando y combatiendo gracias al empujón fabuloso con que me proyectasteis a este mundo...". Me alegro de que esta tesis me sirva al menos para poder agradecerlos una vez todo lo que me habéis dado.

Bueno, creo que eso ha sido todo. Si me he dejado a alguien, ha sido sin mala intención, y espero que sepa perdonármelo. Si la lista es larga, lo es mucho más mi afecto y mi agradecimiento por todos los que están en ella. Sé que este trabajo no hubiera sido posible sin ellos. Por ello, una vez más, gracias de todo corazón.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERO <i>Mycobacterium</i>	3
2. COMPLEJO <i>avium</i>	8
2.1. <i>Mycobacterium intracellulare</i>	10
2.2. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	11
2.3. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	13
2.4. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	17
2.5. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (Map).....	18
3. PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE.....	23
3.1. Distribución e impacto económico.....	23
3.2. Infección y patogenia.....	26
3.3. Signos clínicos y lesiones	28
3.4. Diagnóstico.....	30
3.4.1. Detección del microorganismo.....	31
3.4.1.1. Cultivo bacteriológico.....	31
3.4.1.2. Detección de ADN	32
3.4.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador	33
3.5. Tratamiento y control.....	36
3.5.1. Tratamiento.....	36
3.5.2. Medidas de manejo.....	37
3.5.3. Vacunación.....	38
3.5.4. Persistencia en el ambiente	39
3.6. Paratuberculosis en animales de vida salvaje	41

3.7.	Importancia de <i>Map</i> en Salud Pública	44
3.7.1.	Posible implicación en la enfermedad de Crohn y otras enfermedades	44
3.7.2.	Posibles fuentes de exposición a <i>Map</i> para el hombre	49
4.	IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR EL COMPLEJO <i>M.tuberculosis</i>	52
4.1.	Tuberculosis humana	52
4.2.	Tuberculosis en animales de abasto	53
5.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO <i>avium</i>	59
5.1.	Secuenciación del gen ARNr 16S	59
5.2.	Secuenciación de la región ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)	61
5.3.	Secuenciación del gen <i>hsp65</i>	61
5.4.	Otros genes utilizados en estudios de identificación molecular: <i>SodA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrB</i> , <i>secA</i> , <i>recA</i> , 32K-Da y <i>rpoB</i>	63
5.5.	Técnicas basadas en la detección de secuencias de inserción	66
5.5.1.	IS1245	67
5.5.2.	IS1311	69
5.5.3.	IS900	70
5.5.4.	IS901	71
5.5.5.	IS902	72
5.6.	Otras técnicas de caracterización molecular	72
5.6.1.	Técnicas pre-genómicas	73
5.6.1.1.	PFGE	73
5.6.1.2.	VNTRs, SSRs y MIRUs	75
5.6.1.3.	AFLP	76
5.6.1.4.	RAPD	77
5.6.1.5.	MPIL	79
5.6.2.	Técnicas post-genómicas	80
	OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	87

Capítulo I DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> EN ANIMALES DE VIDA SALVAJE Y PERIDOMÉSTICOS Y SU POTENCIAL IMPORTANCIA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ENFERMEDAD	93
RESUMEN	95
ESTUDIO	97
Capítulo II APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN AISLADOS DE <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> PRESENTES EN EL GANADO DOMÉSTICO EN ESPAÑA	99
RESUMEN	101
ESTUDIO 1	105
ESTUDIO 2	115
Capítulo III INTERFERENCIA DIAGNÓSTICA PROVOCADA POR LA PARATUBERCULOSIS EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE RUTINA DE TUBERCULOSIS EN GANADO VACUNO Y CAPRINO	119
RESUMEN	121
ESTUDIO 1	125
ESTUDIO 2	135
Capítulo IV EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA PRESENTE EN <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>hominissuis</i> MEDIANTE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y VALORACIÓN DE LA SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE SU AISLAMIENTO EN MUESTRAS HUMANAS NO ESTÉRILES	157
RESUMEN	159
ESTUDIO	163
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	183
RESUMEN/SUMMARY	189
BIBLIOGRAFÍA	199

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGID: Inmunodifusión en gel de agar (*Agar Gel Immunodiffusion test*)

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: *American Tissue Culture Collection*

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

IBD: enfermedades inflamatorias del intestine (*Inflammatory Bowel Diseases*)

IDTB: intradermotuberculinización

IFN- γ : interferon-gamma

IL: interleuquina

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

LSP: polimorfismos de secuencia larga (*Large Sequence Polymorphism*)

Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

MAC: complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium Complex*)

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

PFGE: electroforesis en campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

p.i.: prevalencia individual

PPD: derivado proteico purificado (*Purified Protein Derivative*)

p.r.: prevalencia de rebaño

RDA: análisis de representación de diferencias (*Representational Difference Analysis*)

REA: análisis de restricción por endonucleasa (*Restriction Endonuclease Analysis*)

RFLP: análisis de polimorfismos genéticos (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

SNP: mutación puntual (*Single Nucleotide Polymorphism*)

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

1. GENERO *Mycobacterium*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium* complex, MAC), también llamado *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI), pertenecen al género *Mycobacterium*. Según la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, dicho género está encuadrado en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*.

En el género *Mycobacterium* se encuentran descritas bacterias saprofitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales. Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la ácido-alcohol resistencia (debida a su pared de ácidos micólicos), la aerobiosis, la inmovilidad y su imposibilidad para formar esporas.

Se han elaborado numerosas clasificaciones de este género a lo largo de los años, atendiendo primero a características fenotípicas, patogenicidad y, desde finales del siglo pasado, a los genotipos. La clasificación más intuitiva y de más fácil aplicación es aquella que divide las micobacterias en **no cultivables o difícilmente cultivables** (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y **cultivables**. Dentro de estas últimas se establece una subdivisión en micobacterias de

crecimiento rápido (aquellas que dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días) y las de **crecimiento lento** (las que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido). Esta subdivisión basada en la capacidad de crecimiento se confirma al secuenciar el gen que codifica el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S de las micobacterias: mientras que casi todas las micobacterias de crecimiento lento poseen una sola copia del gen ARNr 16S [excepto *M. terrae* (Ninet *et al.*, 1996) y *M. celatum* (Reischl *et al.*, 1998)], las de crecimiento rápido, excepto *M. chelonae* y *M. abscessus*, presentan dos copias (Tortoli *et al.*, 2004). El análisis de la secuencia de este gen, así como de la conformación de su estructura secundaria, ha sido la herramienta más utilizada para los estudios taxonómicos y filogenéticos del género (pág. 59). Así, además de diferenciar los dos grandes grupos determinados por su velocidad de crecimiento, también subdivide las micobacterias de crecimiento lento basándose en la estructura de la hélice 18 (Stahl y Urbance, 1990; Tortoli, 2003; Tortoli, 2006) (Figuras 1, 2 y 3).

Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de especies saprofitas de vida libre, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Con frecuencia son llamadas “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas”, si bien este último término también puede aplicarse a algunas bacterias de crecimiento lento. Algunas especies bacterianas de este grupo han adquirido una mayor relevancia en las últimas décadas debido a su capacidad para producir infecciones en la especie humana, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Desde el punto de vista de Salud Pública, las micobacterias de crecimiento rápido de mayor importancia pertenecen a los grupos *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae/abscessus* y *M. smegmatis* (Brown-Elliott y Wallace, Jr., 2002).

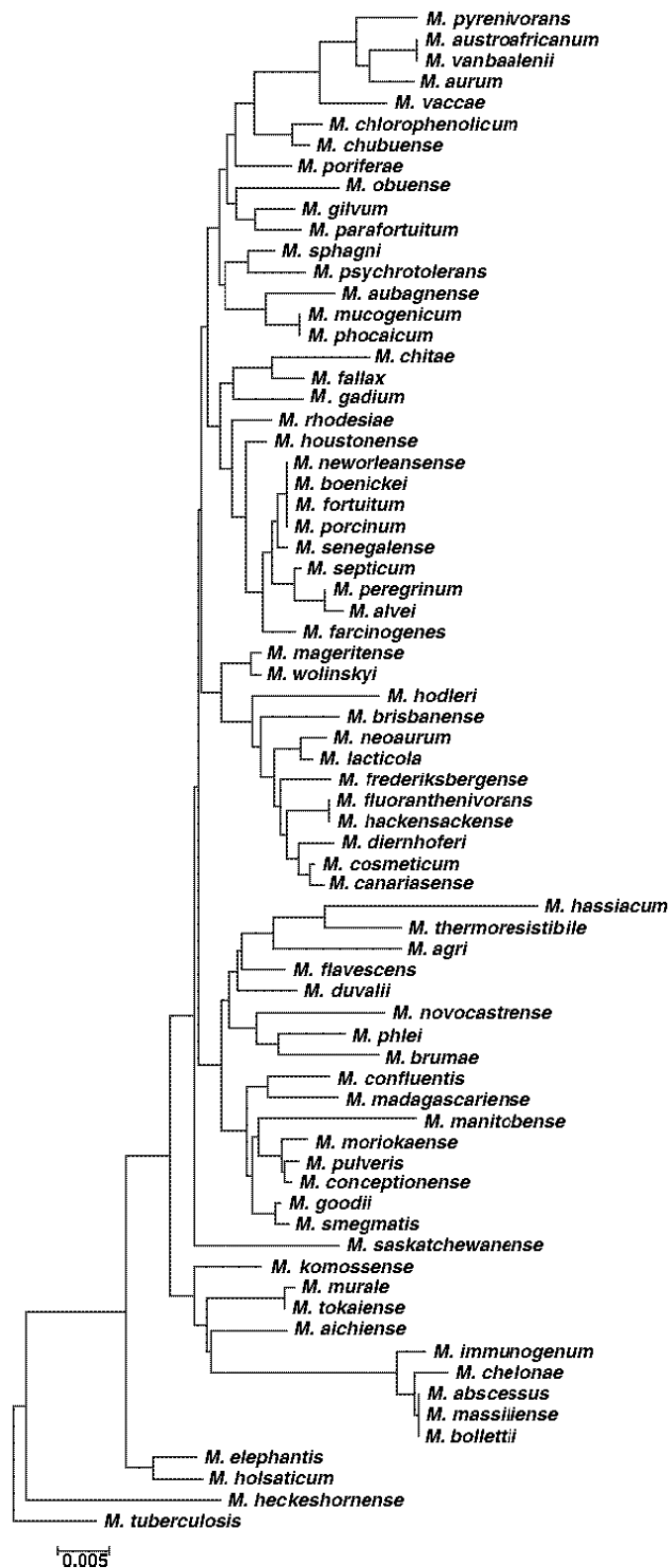


Figura 1. Arbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento rápido (referencia externa: *M. tuberculosis*) (Tortoli, 2006).

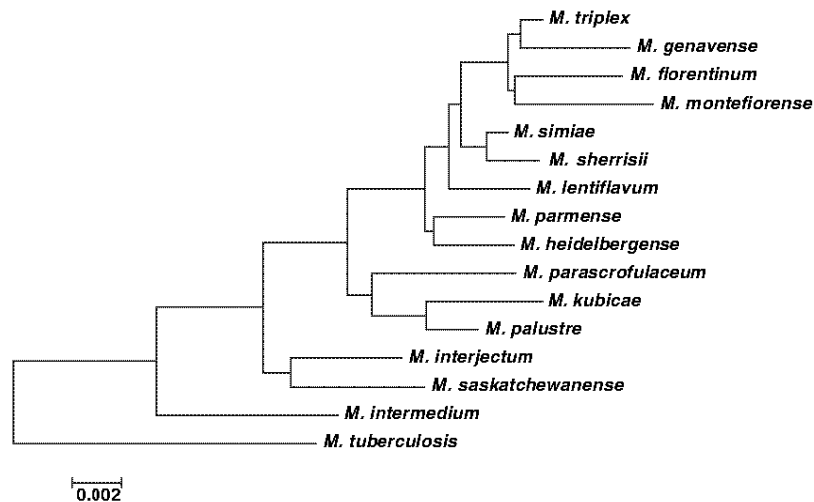


Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento con hélice 18 corta (referencia externa: *M. tuberculosis*). *M. tilburgii* no está incluido porque su secuencia completa de 16S no ha sido publicada en el *Genbank* (Tortoli, 2006).

Por su parte, el grupo de micobacterias de crecimiento lento comprende las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública. En este grupo se encuadra el **complejo *M. tuberculosis***, que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y animal [*M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* (Karlson y Lessel, 1970), *M. africanum* (Castets *et al.*, 1969), *M. microti* (Reed, 1957), *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003), *M. canetti* (van Soolingen *et al.*, 1997), *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003) y el *dassie bacillus* (aislada a partir del damán roquero, *Procavia capensis*) (Wagner *et al.*, 1958)]. Estas especies están estrechamente relacionadas desde el punto de vista de su ADN, por lo que se ha sugerido la conveniencia de la agrupación de todas ellas en una sola especie (Imaeda, 1985); sin embargo, ciertas diferencias fenotípicas, tales como la patogenicidad propia de hospedador en algunos casos (como *M. tuberculosis* en humanos) son consideradas como suficientes para diferenciarlas como especies distintas. El estudio filogenético de este complejo se ve simplificado por el hecho de que no hay evidencia de intercambio genético horizontal, por lo que en la comparación entre los genomas de sus distintas especies las deleciones actúan como marcadores genéticos unidireccionales.



Figura 3. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento con hélice 18 larga (referencia externa: *M. fortuitum*) (Tortoli, 2006).

2. COMPLEJO *avium*

El complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*, MAC) comprende, a diferencia del complejo *M. tuberculosis*, especies con un mayor grado de divergencia genética y que presentan importantes diferencias fenotípicas entre ellas. Las características más sobresalientes comunes a todos sus miembros son su ácido-alcohol resistencia, el crecimiento lento y la producción de un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied *et al.*, 1993). Tradicionalmente este complejo agrupaba dos especies, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, que no podían ser diferenciadas mediante técnicas bioquímicas o por su comportamiento en el cultivo *in vitro* (Meissner *et al.*, 1974). En un primer momento se agrupó también la especie *Mycobacterium scrofulaceum* dentro de este complejo (llamado entonces MAIS), si bien posteriormente quedó establecido de forma inequívoca que dicha especie no tiene una relación con *M. avium* o *M. intracellulare* que lo justifique, por lo que ya no se acepta como miembro de MAC.

Schaefer y colaboradores desarrollaron en 1965 un sistema de seroaglutinación, realizada con células completas y suero policlonal obtenido en conejos, que permitía dividir el complejo en 15 serovares (Schaefer, 1965). Los serovares 1 y 2 fueron definidos en un principio como *M. avium*, ya que las cepas pertenecientes a éstos eran virulentas al ser inoculadas en pollos. Poco después se añadió un nuevo serovar de cepas virulentas, el número 3 (Marks *et al.*, 1969). Los serovares 4-6 y 8-11 se denominaron MAC “intermedios”, pues solo producían lesiones locales en los puntos de inoculación al ser inyectados en pollos. El resto de serovares, totalmente avirulentos para los pollos, se consideraron propios de *M. intracellulare*. El número de serovares pertenecientes a *M. intracellulare* fue aumentando (Wolinsky, 1979), siendo la naturaleza de alguno de estos serovares difícil de determinar. A principios de los 90 se consideró de forma unánime que los serovares 1-6, 8-11 y 21 eran propios de *M. avium*, mientras que el 7, 12-20, 23 y 25 se adjudicaban a *M. intracellulare*; la especie dominante de otros serovares (21, 24, 26 y 28) es sin embargo difícil de precisar (Saito *et al.*, 1990; Wayne *et al.*, 1993).

El rápido avance en el conocimiento del ADN de las micobacterias permitió la diferenciación de estas dos especies mediante técnicas moleculares más fácilmente reproducibles (Rogall *et al.*, 1990). Al observar las propiedades fenotípicas de los distintos aislados que quedaban englobados en la especie *M. avium* se observó que había una gran heterogeneidad: si bien todas estas cepas presentaban una igualdad de más del 90% al realizar técnicas de hibridación ADN-ADN, lo que parece indicar que pertenecen a una misma especie bacteriana (Saxegaard *et al.*, 1988; Saxegaard y Baess, 1988), exhibían marcadas diferencias en

lo referente a su patogenicidad, su velocidad y requerimientos de cultivo *in vitro* y su preferencia de hospedador. Un estudio detallado de estas características fenotípicas y un análisis de ADN mediante restricciones enzimáticas permitió finalmente la subdivisión de la especie *M. avium* en varias subespecies. Así, en 1990 se establecieron tres subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) y *M. avium* subsp. *silvaticum* (Thorel *et al.*, 1990). En el año 2002 se definió una nueva especie, *M. avium* subsp. *hominissuis*, que agrupaba las cepas pertenecientes a *M. avium* subsp. *avium* aisladas con mayor frecuencia de hospedadores humanos y porcinos y del medio ambiente, y que tenían unas características fenotípicas y genotípicas diferentes de los aislados de aves (o “bird-type”) (Mijs *et al.*, 2002).

Pero, además de las especies enumeradas hasta ahora, se ha definido un complejo grupo de aislados que, si bien son clasificados como MAC por algunas técnicas [como las sondas comerciales de ADN Accu-Probe (Gen-Probe, California, EEUU)], no pueden ser asignados de forma inequívoca a ninguna especie. Este grupo, que fue llamado *cluster* X, “no específico” o MAIX (Viljanen *et al.*, 1993) ha sido objeto de varios estudios mediante distintas técnicas de biología molecular en los últimos 20 años, especulándose con la posibilidad de que contuviera nuevas especies de micobacterias (Rogall *et al.*, 1990; Frothingham y Wilson, 1993; Viljanen *et al.*, 1993; Frothingham y Wilson, 1994; Soini *et al.*, 1996). Ha sido en la última década cuando, merced al progresivo conocimiento del *cluster* X, se han definido dos nuevas especies: *M. chimaera* (Tortoli *et al.*, 2004) y *M. colombiense* (Murcia *et al.*, 2006).

Antes de entrar a describir con mayor detenimiento cada una de las especies y subespecies mencionadas anteriormente, conviene destacar una vez más la grandísima variabilidad genética que se ha ido describiendo en el último cuarto de siglo dentro del complejo *M. avium*. En este sentido, la heterogeneidad genética de MAC se asemeja más a la observada en *E. coli* que a la de *M. tuberculosis* (Turenne *et al.*, 2007). Por tanto, seguir describiendo aislados clínicos como pertenecientes a MAC o incluso como *M. avium* resulta del todo inadecuado ya que, aunque el tratamiento antibiótico para todas las especies de MAC es similar (Beggs *et al.*, 2000), supone prescindir de una información necesaria a la hora de valorar las conclusiones de los trabajos de investigación. El hecho de que tradicionalmente no se estableciera la subespecie de *M. avium* de la que se hablaba mediante serotipificación o análisis de ADN en numerosos estudios hace que sea difícil interpretar sus resultados a posteriori, lo que redundaría en una pérdida de información muy valiosa.

2.1. *Mycobacterium intracellulare*

A pesar de haber sido definida como especie distinta de *M. avium* en 1967 (Runyon, 1967), ha sido objeto de menos estudios que las subespecies de la anterior. La dificultad para diferenciar las dos especies de MAC mediante tests de cultivo o bioquímicos ha hecho que tradicionalmente se definieran muchos aislados como “pertenecientes al complejo *M. avium-intracellulare*”, haciendo difícil la interpretación de los resultados en función de la especie. El desarrollo de sondas de ADN específicas para cada especie hace mucho más simple la identificación, aunque hay aislados que pueden no reaccionar a ninguna de ellas, complicando la valoración de los resultados (Saito *et al.*, 1990). En la actualidad todavía hay muchos trabajos que identifican sus aislados como pertenecientes a MAC, ya que los sistemas comerciales son caros, y el tratamiento es el mismo para todas las infecciones (Beggs *et al.*, 2000). La cepa tipo de esta especie, ATCC 13950, procede de un niño fallecido por una infección diseminada (Cuttino y McCabe, 1949).

A pesar de la similitud fenotípica con *M. avium*, el estudio de su ADN ha revelado diferencias significativas en casi todas las dianas moleculares estudiadas, mostrando además una considerable variabilidad intraespecífica (ver caracterización molecular del complejo *avium*, págs. 59-86). No se han detectado secuencias de inserción específicas de esta especie, aunque en ocasiones sí se han obtenido resultados positivos empleando sondas para la detección de elementos propios de *M. avium* como IS1245 (Beggs *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2002).

Se han identificado aislados de *M. intracellulare* de varias especies animales, tanto domésticas como salvajes, en ocasiones causando procesos clínicos graves (Moore *et al.*, 1971; Fleischman *et al.*, 1982; Ritacco *et al.*, 1998; Oloya *et al.*, 2007; Schrenzel *et al.*, 2008; Machackova *et al.*, 2003), aunque no es un patógeno habitual en veterinaria, y su virulencia en aves es muy inferior a la de *M. avium* (Tell *et al.*, 2001). En humanos es un patógeno relevante, capaz de provocar cuadros clínicos similares a los de *M. avium* subsp. *hominissuis*; curiosamente, parece afectar en menor medida a los pacientes infectados de VIH que ésta subespecie (Guthertz *et al.*, 1989; Wayne y Sramek, 1992; Beggs *et al.*, 2000), si bien esto puede representar diferencias en la distribución geográfica de los aislados (Inderlied *et al.*, 1993). Al igual que en el caso de *M. avium*, la fuente de infección puede ser ambiental, ya que esta micobacteria ha sido aislada repetidas veces a partir de muestras de agua en distintas localizaciones (Covert *et al.*, 1999; Aronson *et al.*, 1999; Le Dantec C. *et al.*, 2002; Pryor *et al.*, 2004; Vaerewijck *et al.*, 2005) y puede resistir la cloración (Falkinham, III, 2003a).

2.2. *Mycobacterium avium* subsp. *avium*

Es la especie causal de la tuberculosis aviar, aunque también puede infectar otras especies animales, incluyendo el hombre. La cepa tipo es la ATCC 25291, aislada de una gallina. Los aislados que pertenecen a esta especie eran llamados anteriormente “de tipo aviar” (“bird-type”). A diferencia de *M. avium* subsp. *hominissuis*, todas las cepas de esta especie muestran un genotipo y un fenotipo bastante homogéneo. Así, todas pertenecen a los serovares 1, 2 y 3 (Ritacco *et al.*, 1998; Pavlik *et al.*, 2000c) y son virulentas si se inyectan en pollos; crecen en medios con huevo, no necesitan el aporte exógeno de micobactina para su crecimiento *in vitro* y el pH ácido no estimula su crecimiento; y no crecen a 24°C ni a 45°C. Al ser una micobacteria de crecimiento lento, requiere 3-4 semanas para dar lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos.

En cuanto a su genotipo, uno de los rasgos más característicos es la presentación de más de dos copias de la secuencia de inserción IS901 (pág. 71), que se considera específica de esta subespecie (Kunze *et al.*, 1991; Kunze *et al.*, 1992; Pavlik *et al.*, 2000c). Tradicionalmente se consideraba que poseía tres copias de IS1245, lo que daba lugar al “perfil aviar” al realizar RFLP-IS1245 (Bono *et al.*, 1995; Ritacco *et al.*, 1998), pero recientemente se demostró que ese perfil era producto de hibridaciones cruzadas con IS1311 (IS1311, pág. 69), de modo que ha quedado establecido que en realidad posee una copia de IS1245 y dos de IS1311 (Johansen *et al.*, 2005).

Es una bacteria de indudable interés veterinario: en primer lugar, es el agente causal de la tuberculosis aviar, enfermedad infecciosa transmisible que puede originar cuantiosas pérdidas económicas; esta patología es ahora poco importante en grandes industrias de producción avícola gracias a los programas de prevención (Gill y Blandy, 1986; Radkowski *et al.*, 1996), pero sigue siendo relevante en zoológicos y otras agrupaciones de aves silvestres cautivas (Dvorska *et al.*, 2007; Schrenzel *et al.*, 2008), y en pequeños aviarios (Shitaye *et al.*, 2008); estando incluida en la antigua lista B de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Esta enfermedad está distribuida por todo el mundo, aunque parecen existir regiones o poblaciones en la que es enzoótica (Juan *et al.*, 1996) y otras donde es muy infrecuente, como Japón (Morita *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1996). La tuberculosis aviar afecta a numerosas especies de ave, si bien no todas las especies muestran la misma susceptibilidad, siendo la enfermedad más prevalente en pollos y aves silvestres criadas en cautividad, mientras que patos y gansos parecen más resistentes (Hejlícek y Tremel, 1995). De cualquier forma, la susceptibilidad de las aves a la infección por *M. avium* subsp. *avium* se ve muy influida por otros factores predisponentes, fundamentalmente los que provocan estrés en los animales (Tell *et al.*, 2001). El diagnóstico *in vivo* se ve complicado por el hecho de que los animales enfermos pueden no mostrar signos clínicos, o mostrar un

cuadro inespecífico y muy variable hasta que la enfermedad está muy avanzada (Tell *et al.*, 2001). La tuberculinización cutánea ha sido una herramienta útil en el saneamiento de explotaciones avícolas (Pavlas, 1981; Thorel *et al.*, 1997), aunque su utilidad es menor en otras especies. Otra alternativa diagnóstica es el test de aglutinación en sangre para la detección de anticuerpos, que aunque no es 100% sensible es al menos tan fiable como la tuberculinización (Thorel *et al.*, 1997). La vía de adquisición de la enfermedad es fundamentalmente la fecal-oral, y por ello las lesiones granulomatosas aparecen en primer lugar en el tracto intestinal, y seguidamente en hígado y bazo (Thorel *et al.*, 1997; Tell *et al.*, 2001).

Aunque las aves constituyen su hospedador preferente, esta bacteria también se ha aislado de un amplio rango de mamíferos: así, se ha aislado *M. avium* subsp. *avium* a partir de muestras procedentes de ciervos y ovejas (Ritacco *et al.*, 1998), vacas (de Lisle *et al.*, 1998; Ocepek *et al.*, 2003; Dvorska *et al.*, 2004), roedores (Fischer *et al.*, 2000), cerdos (Ritacco *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Komijn *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2003; Thegerstrom *et al.*, 2005; Mobius *et al.*, 2006), humanos (Picardeau *et al.*, 1997b; Novi *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2000b; Kumar *et al.*, 2006) (si bien en muchos casos solo se identifican los aislados por RFLP-IS1245) e incluso muestras ambientales (Dvorska *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). No obstante, en lo que hace referencia a las muestras ambientales, humanas y porcinas, en la mayoría de los casos el porcentaje de aislados de *M. avium* subsp. *avium* cultivados es muy inferior al de *M. avium* subsp. *hominissuis*.

2.3. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

Esta subespecie bacteriana, de muy reciente definición, se diferencia de *M. avium* subsp. *avium* por sus características fenotípicas (es capaz de crecer en un rango más amplio de temperaturas, entre 24 y 45°C) y genotípicas (secuencia de ITS – *Internal Transcribed Spacer*, ver pág. 61 – variable, perfil de RFLP-IS1245 multibanda) (Mijs *et al.*, 2002). Estas bacterias están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, que puede constituir una fuente de infección para humanos (Primm *et al.*, 2004) y animales (Matlova *et al.*, 2004).

Es sin duda la subespecie más heterogénea de *M. avium*, ya que la aplicación de técnicas de caracterización molecular detecta una mayor variabilidad en ella comparada con los patógenos estrictos *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: así, además de la secuencia de ITS, también presenta diferencias en el gen *hsp65* (Turenne *et al.*, 2006) y un mayor polimorfismo a nivel de LSPs (*Long Sequence Polymorphisms*) (Semret *et al.*, 2004; Semret *et al.*, 2006c). Es una bacteria saprofita, de mucha menor patogenicidad que las dos anteriores, y que se comporta como un patógeno oportunista.

A nivel veterinario esta especie presenta un interés más reducido, ya que no suele originar enfermedad clínica en los animales. Su impacto más relevante se da en la especie porcina, donde puede originar lesiones granulomatosas, fundamentalmente en los linfonodos situados en la cabeza y mesentéricos (Thorel *et al.*, 1997; Thorel *et al.*, 2001). A pesar de que los cerdos no muestran signos clínicos, el hallazgo de estas lesiones en el matadero puede dar lugar a un importante descenso en el valor económico del animal (Matlova *et al.*, 2004), habiéndose descrito casos en todos los continentes (Nel, 1981; Bono *et al.*, 1995; Feizabadi *et al.*, 1996a; Ritacco *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Komijn *et al.*, 1999; Thorel *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Matlova *et al.*, 2004; Thegerstrom *et al.*, 2005; Matlova *et al.*, 2005; Mobius *et al.*, 2006; Johansen *et al.*, 2007; Tirkkonen *et al.*, 2007). En ocasiones es difícil precisar si en los estudios publicados se describen aislamientos de *M. avium* subsp. *hominissuis* o *M. avium* subsp. *avium* debido a una incompleta caracterización de las cepas; de cualquier forma, en la mayoría de los trabajos en los que sí se realiza una identificación completa de los aislados, la proporción de la primera subespecie suele ser mayor que la segunda, con algunas excepciones (Thegerstrom *et al.*, 2005; Mobius *et al.*, 2006), tal vez debido a distintos factores de exposición. La ubicación de las lesiones indica que la vía de infección es normalmente oral, aunque se han descrito lesiones circunscritas a linfonodos bronquiales (di Guardo G. *et al.*, 1991).

También se ha aislado de muestras de vacuno (Dvorska *et al.*, 2004), aunque al igual que sucede en porcino, en muchos estudios no se llega a diferenciar entre *M. avium* subsp.

hominissuis o *M. avium* subsp. *avium*, y resulta difícil estimar la prevalencia real de infección. Tampoco origina cuadros clínicos, ya que el vacuno parece resistente a la infección (Weiss *et al.*, 2002), aunque puede dar lugar a lesiones visibles en matadero que se lleguen a confundir con las producidas por *M. bovis* (Thorel *et al.*, 1997). La importancia fundamental de *M. avium* en el vacuno radica en su capacidad para inducir falsas reacciones positivas o negativas en los tests de diagnóstico de la tuberculosis bovina, pudiendo comprometer así el éxito de los planes de erradicación (Lauzi *et al.*, 2000; Walravens *et al.*, 2002; Amadori *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2005; Hope *et al.*, 2005). Al ser *M. avium* subsp. *hominissuis* la subespecie más ampliamente distribuida, es probable que sea la causante de un gran porcentaje de las sensibilizaciones inespecíficas producidas en el marco de las campañas de saneamiento.

Aunque de forma poco frecuente, también se han publicado estudios de infecciones en la especie equina por *M. avium* (normalmente, sin precisar la subespecie) causando diversos cuadros, desde artritis sépticas (Hewes *et al.*, 2005) a problemas oculares (Leifsson *et al.*, 1997), abortos (Cline *et al.*, 1991; Helie y Higgins, 1996), pérdida de peso e hipoproteinemia (Buergelt *et al.*, 1988) e incluso infecciones generalizadas (Gunnes *et al.*, 1995).

De forma más o menos esporádica también se ha aislado *M. avium* de animales de compañía (Horn *et al.*, 2000; O'Toole *et al.*, 2005; Naughton *et al.*, 2005) y fauna salvaje (Cho *et al.*, 2006), pero normalmente en casos aislados.

De mucha mayor relevancia es el papel del complejo *avium* en general y de *M. avium* subsp. *hominissuis* en particular como patógenos oportunistas en Salud Pública. Desde el primer caso de infección en humanos por un miembro de MAC publicado en 1943 (Feldman *et al.*, 1943) hasta la aparición del virus del SIDA, se describían fundamentalmente dos presentaciones (Wayne y Sramek, 1992; Inderlied *et al.*, 1993; Falkinham III, 1996; Ashford *et al.*, 2001):

- una forma pulmonar, normalmente en individuos inmunocompetentes pero con otras enfermedades respiratorias predisponentes como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis, tuberculosis previas, enfisema o fibrosis quística. La sintomatología de este cuadro es altamente inespecífica, con fiebre, fatiga, sudores, tos no productiva y hemoptisis.
- causando linfadenopatías, fundamentalmente en niños, y afectando a linfonodos cervicales, submaxilares, preauriculares o submandibulares.

La importancia de esta bacteria en Salud Pública ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a la combinación de una serie de factores: por una parte, la aparición del VIH, el progresivo envejecimiento de la población en los países desarrollados y el incremento en el uso de terapias inmunosupresoras, han aumentado la población inmunodeprimida y por

tanto susceptible a MAC (Falkinham III, 2003b); por otra, la creciente implantación a nivel mundial de tratamientos potabilizadores del agua puede producir una selección positiva de bacterias resistentes a la cloración, como los miembros de MAC (Falkinham III, 2003a; Primm *et al.*, 2004).

Por todo ello, la epidemiología de MAC ha ido evolucionando hacia la aparición de nuevas formas: en individuos inmunosuprimidos puede provocar infecciones generalizadas, siendo la infección por VIH el factor de riesgo más importante asociado con la enfermedad por *M. avium* (Inderlied *et al.*, 1993). Desde la primera noticia de infección diseminada por MAC en pacientes con SIDA en 1982 (Zakowski *et al.*, 1982) se han publicado numerosos trabajos en relación a estas dos enfermedades, describiendo frecuencias de infección por MAC del 10-20% hasta el 50% en pacientes con SIDA en países desarrollados (Horsburgh, Jr., 1991; Nightingale *et al.*, 1992; Ashford *et al.*, 2001), aunque con la instauración de las terapias anti-retrovirales y tratamientos antibióticos combinados frente a MAC esos números han disminuido considerablemente con posterioridad (Horsburgh, Jr. *et al.*, 2001; Karakousis *et al.*, 2004). Cabe destacar que la cepa de *M. avium* subsp. *hominissuis* cuyo genoma ha sido secuenciado, *M. avium* 104, fue aislada de un paciente con VIH en California a mediados de los 80.

Además MAC también puede producir patologías pulmonares en pacientes inmunocompetentes sin otras enfermedades respiratorias predisponentes: este cuadro, que en ocasiones recibe el nombre de “síndrome de Lady Windermere”, afecta preferentemente a mujeres no fumadoras de edad madura, y su incidencia ha aumentado en los últimos años (Falkinham III, 2003b; Field *et al.*, 2004; Martíns *et al.*, 2005; Tutor-Ureta *et al.*, 2006)

Por último, *M. avium* puede ser aislado de muestras procedentes de pacientes sin patologías aparentes, indicando una posible contaminación de la muestra o una colonización transitoria del hospedador (Aronson *et al.*, 1999). Esto último dificulta en gran medida la interpretación de cultivos positivos de *M. avium* a partir de muestras no estériles, por lo que la *American Thoracic Society* (ATS) estableció unos requisitos para identificar aquellos pacientes que deben ser considerados como enfermos de MAC (1997).

A pesar de ser una enfermedad de gran relevancia la epidemiología de la misma no está clara: al estar causada por una micobacteria ubicua, la fuente de infección en pacientes humanos no siempre llega a ser identificada. Aunque *M. avium* puede infectar muchos animales silvestres y domésticos, éstos no suelen considerarse una fuente de infección importante para el hombre, y la transmisión entre personas no ha sido documentada. En la actualidad el agua contaminada con *M. avium* se considera el mayor factor de riesgo en la adquisición de la

enfermedad (Inderlied *et al.*, 1993; Falkinham III, 1996), especialmente teniendo en cuenta que se ha comprobado que los miembros de MAC pueden colonizar de forma persistente los sistemas de canalización de agua en edificios públicos y hospitales y por tanto ser una fuente de infección para poblaciones susceptibles (Von Reyn *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1999; Primm *et al.*, 2004; Vaerewijck *et al.*, 2005). En ocasiones, sin embargo, el agua puede contaminar muestras clínicas, complicando la interpretación de los resultados (Aronson *et al.*, 1999).

El tratamiento de las infecciones por MAC depende del cuadro de presentación de la enfermedad, habiéndose ensayado con múltiples combinaciones de antibióticos (Falkinham III, 1996). En la actualidad la mayoría de los tratamientos consisten en el uso de claritromicina o azitromicina combinados con etambutol, rifampicina o rifabutina (Inderlied *et al.*, 1993; 1997; Horsburgh, Jr. *et al.*, 2001). En el caso de pacientes con VIH es conveniente administrar quimioprofilaxis con estos mismos antibióticos si el recuento de CD4 es menor de 50-100 células/mL (Horsburgh, Jr. *et al.*, 2001). En el caso de linfadenitis causadas por *M. avium*, el tratamiento recomendado es la cirugía, que presenta una tasa de éxito del 95% (Schaad *et al.*, 1979; 1997).

2.4. *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*

También llamada la “micobacteria de la paloma torcaz” (*wood pigeon mycobacteria*) debido a que fue aislada en primer lugar de esta especie animal (Christiansen et al., 1946), sus características diferenciales con otros miembros de MAC (particularmente con *M. avium* subsp. *avium*) siguen siendo un motivo de debate. Estudios basados en la comparación de ADN determinaron una relación muy estrecha con *M. avium* y *Map* (Saxegaard y Baess, 1988), y recibió su nombre actual en 1990 basándose la diferenciación de las otras subespecies en sus características fenotípicas (Thorel et al., 1990). Algunos de sus principales rasgos distintivos son su dependencia de micobactina en aislamiento primario, aunque no en posteriores subcultivos (Matthews et al., 1978; Thorel, 1984), y su incapacidad para crecer en medios que incorporen huevo en su composición (Thorel et al., 1990). Además de aves, esta bacteria también puede infectar rumiantes salvajes y domésticos, provocando lesiones similares a las de tuberculosis (Jorgensen y Clausen, 1976; Collins et al., 1985). Su cepa tipo es la ATCC 48898 (*strain 6409*), aislada de una paloma torcaz.

La polémica sobre la diferenciación real entre *M. avium* subsp. *silvaticum* y el resto de MAC deriva del hecho de que, a pesar de los grandes avances en el estudio molecular logrados en el campo de la microbiología en los últimos 20 años, no se han llegado a caracterizar grandes polimorfismos a nivel genético característicos de esta subespecie. Un estudio realizado mediante el empleo de electroforesis en campo pulsado describió una uniformidad en los perfiles obtenidos a partir de *M. avium* subsp. *silvaticum* respecto a los de otros miembros de MAC (Levy-Frebault et al., 1989), pero este método no es adecuado para delimitar especies bacterianas (Turenne et al., 2007). La secuencia de inserción IS902 fue descrita en un principio como un elemento específico de *M. a. silvaticum* (Moss et al., 1992a), pero la comparación con IS901 revela una homología mayor del 99%, poniendo en duda la diferencia real entre las dos (Turenne et al., 2007). Otra secuencia descrita inicialmente en esta subespecie y en *Map*, el elemento GS (Tizard et al., 1998), también ha sido encontrado en aislados de *M. avium* subsp. *avium* (Bull et al., 2000b). Tampoco la secuenciación del gen *hsp65* (Turenne et al., 2006) o el estudio de LSPs (Semret et al., 2006c) revelan diferencias entre *M. avium* subsp. *avium* y *silvaticum*, a pesar de que sí se detectan polimorfismos respecto a las otras subespecies. Por todo ello, y a la espera de nuevas evidencias que diferencien estas dos subespecies, resulta lógico especular con la posibilidad de que *M. avium* subsp. *silvaticum* represente un subtipo de *M. avium* subsp. *avium* adaptado a un hospedador específico (la paloma torcaz) (Turenne et al., 2007).

2.5. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map)

Es la bacteria más importante del complejo *avium* desde el punto de vista veterinario, ya que es el agente causal de una enfermedad de gran relevancia: la paratuberculosis o enfermedad de Johne.

Esta bacteria, descrita por primera vez en 1895 (Johne y Frothingham, 1895), recibió el nombre de *Mycobacterium paratuberculosis* en 1923 (Bergey *et al.*, 1923), y fue considerada una micobacteria distinta de la aviar con base en sus diferencias fenotípicas. Sin embargo, con la llegada de las técnicas de estudio genético, se comprobó la elevada homología existente entre *Map* y *Mycobacterium avium* (Saxegaard *et al.*, 1988; Saxegaard y Baess, 1988). Por ello, en 1990 se agruparon estas dos especies, junto con la micobacteria de la paloma torcaz, quedando todas ellas agrupadas como subespecies de *M. avium* (Thorel *et al.*, 1990).

Map es un patógeno intracelular obligado cuyas características fenotípicas diferenciales más sobresalientes son fundamentalmente su dependencia del aporte exógeno de micobactina para su cultivo *in-vitro* y la extremada lentitud de su crecimiento. La micobactina es un agente quelante del hierro, necesario para el transporte de este metal al interior de la célula. Para el cultivo inicial de *Map* se utilizó la micobactina P, obtenida a partir de cultivos de *Mycobacterium phlei* (Francis *et al.*, 1953). En la actualidad está extendido el uso de la micobactina J, obtenida a partir de cepas de *Map* modificadas tras múltiples pases en medios de cultivo en el laboratorio (Merkal y McCulloch, 1982). Sin embargo, la capacidad de ciertas cepas de *Map* para crecer en ausencia de micobactina (Adúriz *et al.*, 1995) o gracias al aporte de otras sustancias que aporten el hierro necesario para el metabolismo bacteriano (Merkal y Curran, 1974), así como la facultad para sintetizar micobactina por parte de ciertas cepas (Merkal y McCulloch, 1982; Barclay *et al.*, 1985) ponen en cuestión la especificidad de la necesidad del aporte de micobactina en *Map*, al menos para algunas cepas. Del mismo modo, si bien la velocidad de crecimiento *in vitro* de *Map* no suele ser menor de 4 meses, se han descrito importantes diferencias entre distintas cepas, remarcando la existencia de al menos dos fenotipos dentro de esta subespecie.

Desde el punto de vista genético, *Map* es una de las dos bacterias del complejo *avium* cuyo genoma ha sido secuenciado por completo, el de la cepa k10 (Li *et al.*, 2005), constando de 4.829.781 pares de bases que forman un único cromosoma circular y codifican 4350 ORFs, 45 ARNt y un operón ARNr. Mediante técnicas de análisis *in silico* se han identificado más de 3000 genes homólogos a otros descritos en *M. tuberculosis*, así como 161 regiones genómicas únicas que codifican 39 genes de *Map* que no habían sido descritos antes. Antes de la finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *Map* ya habían sido descritas varias secuencias y

elementos específicos en su ADN: el primero y más utilizado de todos ha sido sin duda el IS900, si bien puede plantear problemas de especificidad (ver IS900, pág 70). Para solucionar ese problema, el uso de otras secuencias alternativas ha sido contemplado en distintos estudios:

- **f57**: es una secuencia de 620 pb presente en una sola copia en el ADN de *Map*, descrita en 1993 (Poupart *et al.*, 1993) que hasta la fecha no ha sido encontrada en otras especies bacterianas. Ha sido utilizado como diana en PCRs combinadas con el gen p34 para diferenciar entre *M. bovis*, *M. avium* y *Map* (Coetsier *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 2005), con IS900 y otras secuencias de ADN para conseguir una PCR 100% específica de *Map* (Vansnick *et al.*, 2004; Tasara *et al.*, 2005; Mobius *et al.*, 2008) y como diana de técnicas de PCR en tiempo real (Herthnek y Bolske, 2006), en algunos casos diseñadas para la detección de *Map* en muestras de leche y quesos (Tasara y Stephan, 2005; Bosshard *et al.*, 2006; Stephan *et al.*, 2007).
- **hspX**: este gen codifica una proteína similar a la familia de proteínas de resistencia al estrés por calor. Está presente en una única copia en el genoma de *Map*, y se considera específico de esta subespecie. Fue descrito en 1998 (Ellingson *et al.*, 1998), y fue la primera proteína de *Map* cuya presencia fue demostrada en macrófagos bovinos infectados (Bannantine y Stabel, 2000). En un estudio posterior no se detectó en el 100% de los aislados de *Map* analizados (Ellingson *et al.*, 2000). Ha sido empleado como diana de PCRs directas sobre tejidos y alimentos para la detección de ADN de *Map*, si bien mostrando una menor sensibilidad que IS900 (Miller *et al.*, 1999; Ellingson *et al.*, 2005b; Clark, Jr. *et al.*, 2006). También se ha utilizado para crear un control interno de PCRs a tiempo real (Brey *et al.*, 2006).
- **Locus 251 y 255**: estos *loci*, descubiertos al realizar una comparación *in silico* entre los genomas de *Map* y *M. avium* como secuencias sólo presentes en el primero (Bannantine *et al.*, 2002), han sido empleados como dianas de PCRs, demostrando su especificidad y por tanto su utilidad para la detección de ADN de *Map* (Motiwala *et al.*, 2003; Motiwala *et al.*, 2004; Sibley *et al.*, 2007; Mobius *et al.*, 2008)
- **ISMav2**: es una secuencia de inserción detectada en aislados de *Map* (al menos tres copias) pero ausente en cepas de *M. avium avium* y posiblemente *M. avium* subsp. *hominissuis* (Strommenger *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2004). Posteriormente ha sido empleado para la detección de *Map* en leche (Stratmann *et al.*, 2002), aunque en un estudio ulterior el empleo de los oligonucleótidos descritos por Stratmann y

colaboradores dio lugar a falsos positivos en aislados de *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y otras dos especies no incluidas en el género *Mycobacterium* (Mobius *et al.*, 2008).

- **ISMpa1:** esta secuencia de inserción tiene 1500 pb y pertenece a la familia IS110. Se detectó inicialmente en todos los aislados de *Map* analizados (n=11) y en algunas cepas de *M. avium* subsp. *hominissuis* aisladas de muestras porcinas, pudiéndose diferenciar ambas subespecies mediante RFLP-ISMpa1 (Olsen *et al.*, 2004). La existencia de esta secuencia de inserción en un subgrupo de aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis* aislados de porcino (y su ausencia en *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *hominissuis* de muestras humanas) fue confirmada en un estudio posterior (Johansen *et al.*, 2007), aunque la distribución de este elemento debería estudiarse también en un panel mayor de aislados de *Map* para confirmar su presencia en esta subespecie.
- **ISMap02:** este elemento, de 1674 pb y presente en 6 copias en el genoma de *Map* k10 (Paustian *et al.*, 2004), fue evaluado como diana de PCRs convencionales y de tiempo real, mostrando unos resultados de sensibilidad y especificidad muy prometedores, comparables a los obtenidos al emplear IS900 (Stabel y Bannantine, 2005).

Al aplicar distintas técnicas de caracterización molecular en el complejo *avium*, los aislados de *Map* siempre ofrecieron una mayor homogeneidad que los de *M. avium* subsp. *hominissuis* o *M. intracellulare*. Sin embargo, desde que comenzaron a aplicarse las primeras técnicas de caracterización molecular basadas en el estudio de todo el cromosoma bacteriano se describieron dos grupos bien diferenciados de perfiles: en diversos estudios independientes, el RFLP-IS900 separó las cepas aisladas de muestras de ovino y de caprino (y que presentaban una velocidad de crecimiento extremadamente lenta) de las cepas procedentes de vacuno y de otras especies, incluyendo algunas de pequeños rumiantes (ver RFLP, pág. 66). Al estandarizar el protocolo se definieron tres grupos, Bovino (*Cattle*), Ovino (*Sheep*) e Intermedio (*Intermediate*) (Pavlik *et al.*, 1999). Aplicando una técnica distinta, y dirigida a otras dianas en el cromosoma bacteriano, los mismos resultados se obtuvieron mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) dividiéndose los aislados analizados en tres grandes grupos, que se llamaron I, II y III (ver PFGE, pág. 73). El inconveniente fundamental de estas técnicas es la necesidad de utilizar una gran cantidad de ADN bacteriano, lo que, en ocasiones, no es fácil cuando se trabaja con micobacterias de cultivo tan lento y difícil como *Map*.

Al ir aplicando técnicas moleculares sobre nuevas dianas genéticas, la diferencia existente entre estos grupos ha seguido poniéndose de manifiesto, si bien en algunos casos solo

se pueden diferenciar los tipos I y II, quedando los aislados de tipo III integrados junto a los I: es el caso del SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, o mutación puntual) descrito en la secuencia de inserción IS1311 (pág. 69), la secuenciación del gen *hsp65* (Turenne *et al.*, 2006) o la PCR diseñada por Collins y colaboradores dirigida a la región adyacente a la secuencia de inserción de IS900 (Collins *et al.*, 2002). En un estudio realizado sobre 25 genes en aislados de *Map* de tipo I y II, Marsh y colaboradores detectaron 11 SNPs pertenecientes a 8 genes (*hsp65*, *sodA*, *dnaA*, *dnaN*, *recF*, *gyrB*, *inhA* y *pks8*) que podían diferenciarlos, aunque por desgracia no se incluyó una cepa de tipo III en la comparación (Marsh y Whittington, 2007). Del mismo modo, la secuenciación del IS900 en un pequeño panel de cepas de *Map* reveló que, mientras que las cepas de tipo II mostraban una secuencia idéntica con la descrita en *Map* k10, todas las cepas de tipo I mostraban indeterminaciones en dos *loci* en concreto (Semret *et al.*, 2006b). Por último, al realizar análisis mediante RDA (*Representational Difference Analysis*) se detectaron otros tres *loci* específicos de las cepas de tipo I ausentes en las de tipo II (y curiosamente presentes en *M. avium*) (Dohmann *et al.*, 2003). En el único análisis basado en PCR capaz de distinguir los tres tipos de cepas de *Map* realizado hasta la fecha, Castellanos y colaboradores encontraron varios SNPs en los genes *gyrA* y *gyrB* que podían ser puestos de manifiesto mediante PCR-REA (*Restriction Endonuclease Analysis*), dando distintos patrones de bandas para cada uno de los tipos de aislado (Castellanos *et al.*, 2007).

Estas diferencias, presentes en forma de SNPs o pequeños fragmentos de ADN, se ven confirmadas por los LSPs detectados al realizar *microarrays* con cepas de tipo I en comparación con el genoma secuenciado de la cepa k10: tres grandes fragmentos de ADN, presentes en *Map* k10, no fueron detectados en cepas de tipo I (Marsh y Whittington, 2005; Marsh *et al.*, 2006; Semret *et al.*, 2006c) (Ver técnicas post-genómicas, página 80).

Estos distintos grupos no están distribuidos geográficamente de forma uniforme. Así, mientras que el tipo II es el más ampliamente extendido (es el más frecuente en Europa) y ha sido aislado a partir de un amplio rango de hospedadores (Collins *et al.*, 1990a; Pavlik *et al.*, 1995; Pavlik *et al.*, 1999; Greig *et al.*, 1999), los tipos I y III han sido cultivados con mucha menor frecuencia, y normalmente se aíslan de especies rumiantes domésticas (Collins *et al.*, 1990a; Cousins *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000b; Whittington *et al.*, 2001b; Stevenson *et al.*, 2002; de Juan *et al.*, 2005; de Juan *et al.*, 2006a; Sevilla *et al.*, 2007).

Combinando los distintos hallazgos obtenidos a través de dos aproximaciones moleculares opuestas (SNPs frente a LSPs) se ha especulado sobre la posible filogenia de las especies de *M. avium* y, en particular, sobre la evolución de los tipos de *Map* a partir de *M. avium*: partiendo de la base de que todas las subespecies de *M. avium* han evolucionado a partir

de un ancestro común, los hallazgos iniciales de características comunes entre *M. avium* y aislados de tipo I, pero distintos en los de tipo II [como el SNP en IS1311 (Whittington *et al.*, 1998) o los fragmentos pig-RDA10, pig-RDA20 y pig-RDA30 (Dohmann *et al.*, 2003)] plantearon la posibilidad de que el tipo I fuera un estado evolutivo intermedio entre el ancestro común y el tipo II, que experimentó más alteraciones en su genoma. Sin embargo, la reciente descripción de tres grandes deleciones en el tipo I respecto al tipo II cuya secuencia está conservada en *M. avium* 104 en su mayor parte (aunque invertida en algunas partes) (Marsh *et al.*, 2006), y el hecho de que los 11 SNPs diferenciadores de los tipos I y II descritos por Marsh y colaboradores estuvieran repartidos casi por igual en el genoma de *M. avium* 104, (6 SNPs propios de tipo I y 5 del tipo II) (Marsh y Whittington, 2007) cuestiona esa mayor proximidad propuesta entre *M. avium* y *Map* tipo I. En la actualidad se están realizando también *microarrays* comparando los genomas de *M. avium* 104 y *Map* k10 con cepas de tipo III en un intento de esclarecer las características diferenciales de ese subgrupo (Castellanos *et al.*, manuscrito en preparación). Sin duda la próxima publicación del genoma de la cepa S (tipo I) (Paustian *et al.*, 2007) ofrecerá nuevas respuestas a la relación filogenética entre los distintos grupos de aislados de *Map*.

3. PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE

Desde el punto de vista clínico, la paratuberculosis es una enfermedad del tracto digestivo propia de los rumiantes, que cursa como una enteritis granulomatosa crónica y provoca grandes pérdidas económicas a nivel mundial cuando afecta a rumiantes domésticos (Harris y Barletta, 2001). Fue descrita por primera vez en 1895 por Johnne y Frothingham (Johnne y Frothingham, 1895), y su agente causal fue cultivado por primera vez en 1912 por Twort y colaboradores (Twort y Ingram, 1912). Está considerada por la OIE (*Office International des Epizooties*) como una enfermedad de gran importancia global, incluida en su lista única de enfermedades (http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2008.htm#ListeOIE)

3.1. Distribución e impacto económico

Estimar la prevalencia real de la paratuberculosis plantea numerosas dificultades, fundamentalmente por dos motivos: por una parte, al no ser una enfermedad de declaración obligatoria en gran parte de los países desarrollados, los datos disponibles son normalmente limitados, y hacen referencia a regiones o provincias más que a países, introduciendo en ocasiones importantes sesgos en la selección de los animales/rebaños. Por otra parte, la baja sensibilidad que ofrecen todas las técnicas diagnósticas disponibles (ver diagnóstico, pág. 30), la ausencia de signos clínicos patognomónicos y el largo periodo de incubación (ver signos clínicos, pág. 28) complica la detección de los animales infectados. La técnica más utilizada para determinar la prevalencia es el ELISA de detección de anticuerpos, ya que es el test más adecuado para analizar grandes números de muestras (pág. 35), estimándose prevalencia a nivel individual (p.i.) y a nivel de rebaño (p.r.). Se ha detectado en numerosos países del mundo, normalmente con prevalencias mayores en ganado lechero que en ganado de carne.

En Europa la mayoría de estudios recientes relativos a prevalencias proceden de los países occidentales, y se basan fundamentalmente en vacuno de aptitud lechera. En una reciente revisión de la literatura al respecto, Nielsen estimó unas p.i. alrededor del 20% en algunos países (Francia, Alemania, Turquía), y un mínimo de 3-7% en otros (Inglaterra, Italia), sin que se aportaran datos que demostraran que ningún país estuviera libre de la enfermedad (Nielsen y Toft, 2007a). La p.r. estimada en distintos países podía ser mayor del 50%. El autor resaltó la dificultad de comparar varios trabajos, debido a las distintas herramientas diagnósticas utilizadas. Trabajos publicados en Holanda describieron una p.i. de 2,7-6,9% y una p.r. de 31-71% (dependiendo de la sensibilidad y especificidad estimadas para el ELISA) (Muskens *et al.*, 2000). En Bélgica, la p.i. fue 2% y la p.r. 6% (Boelaert *et al.*, 2000). En Austria se observó una p.i. de 19% (Dreier *et al.*, 2006). En algunas partes de Alemania se describió una p.i. de 12,2%, y una p.r. de

84,7%. (Hacker *et al.*, 2004). Un estudio de paratuberculosis en Dinamarca reveló una p.i. de 8,8% y una p.r. de 86,3% en ganado de leche (Jakobsen *et al.*, 2000). En Italia se han descrito p.i. de 2,8% y p.r. de 11,9% en algunas regiones (Kennedy y Benedictus, 2001). La p.i. en Francia oscila entre 0,02% y 4,57% según los departamentos (Dufour *et al.*, 2004). La p.r. descrita en Inglaterra y Gales en la década pasada fue de 17,4%, con una mayor incidencia en la zona sur (Cetinkaya *et al.*, 1998). En Suecia, por otra parte, se detectan tasas muy bajas de infección en ganado de carne, con solo un positivo desde que se implantó un programa de control mediante cultivo de heces en 1998; en ganado de leche no se han reseñado casos (Englund, 2002)

Los estudios realizados en Estados Unidos revelan unas p.i. de 3,4% y 0,4% en ganado de leche y carne, respectivamente, y unas p.r. de 21,6% y 7,9% (Wells y Wagner, 2000a; Dargatz *et al.*, 2001b). En los saneamientos llevados a cabo en las distintas provincias de Canadá se detectan p.i. que oscilan entre 1,3 y 7%, y p.r. de 33,3-74% (Chi *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003; VanLeeuwen *et al.*, 2005; Tiwari *et al.*, 2006; VanLeeuwen *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007b). En Australia se observa una distribución muy desigual de la enfermedad, con algunos estados presentando importantes niveles de infección (22% en Victoria, 9% en New South Wales) mientras que otros estados están libres de la enfermedad (Queensland, Northern Territory) (Kennedy y Allworth, 2000).

Esta enfermedad también es importante en otros países del mundo: en este sentido se ha observado una p.i. de 7,1% en vacuno en Corea del Sur (Park *et al.*, 2006), p.i. mayores de 20% en varias áreas de la India (Singh *et al.*, 2008), y se ha diagnosticado por primera vez la presencia de la enfermedad en Egipto (Salem *et al.*, 2005).

Aunque no se han realizado tantos estudios en pequeños rumiantes, se han descrito problemas de paratuberculosis en estas especies en varios países: en Grecia se detectó un 9,8% de ovejas positivas en test de detección de inmunidad celular (Dimarelli *et al.*, 1991). En la revisión citada anteriormente se destacó la ausencia de trabajos en estas especies, informando de p.i. de 14% en caprino y 2% en ovino en Noruega, y una p.r. mayor del 23% en Suiza (Nielsen y Toft, 2007a). En Australia el ovino también es una especie muy afectada, siguiendo la enfermedad el mismo patrón geográfico que en el vacuno (prevalencias de rebaño de hasta el 40% en área de New South Wales y por debajo del 1% en el resto de estados, con una p.r. para el conjunto del país de 2,24-4,4%) (Kennedy y Allworth, 2000; Sergeant y Baldock, 2002).

En lo relativo a España, se diagnosticó la enfermedad hace más de 20 años en las tres especies rumiantes domésticas, ovino (Aller *et al.*, 1973), caprino (Garrido y León, 1979) y vacuno (Juste *et al.*, 1983). Aunque no hay datos de prevalencias a nivel nacional, la

paratuberculosis es importante en las tres especies. En bovino se han observado prevalencias bajas en el País Vasco, con una p.i. de 0,5% mediante cultivo bacteriológico, (Adúriz *et al.*, 2000); mediante histopatología se encontró una p.i. de 28,3% y p.r. de 32,9% en vacuno del norte de España (Balseiro *et al.*, 2003). Un trabajo realizado mediante detección de IS900 en un pequeño número de muestras de tanque de leche de toda España detectó prevalencias alrededor del 10% (Sevilla *et al.*, 2003). Un reciente estudio utilizando un ELISA comercial en vacuno de Galicia arrojó unas p.i. de 3,02%, 1,03% y 2,83% en ganado lechero, de carne, y en ganado de granjas con ambas finalidades respectivamente; las p.r. observadas fueron 10,69% para explotaciones de leche, 0% de carne y 2,71% en explotaciones mixtas (Dieguez *et al.*, 2007).

En lo relativo a pequeños rumiantes, se han descrito tasas de positividad (p.i.) en caprino alrededor del 40% en Huelva, del 10% en Córdoba y del 3% en las Islas Canarias mediante ELISA (Molina *et al.*, 1991), p.r. del 38% en rebaños de caprino y ovino en Ávila estimada mediante AGID (Reviriego *et al.*, 2000), y p.i. de 11,7% en caprino y ovino en el área de Madrid (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1998). Mediante análisis anatomopatológicos se observó una p.i. de 49,4% en ovino de Aragón (Pérez *et al.*, 1996). Por último, en un estudio realizado en caprino de la Comunidad de Madrid se observó un 42,2% de p.i. mediante ELISA; al analizar estos animales usando cultivo bacteriológico el resultado fue una p.i. de 29,7% y p.r. de 64,3% (de Juan, 2005)

La paratuberculosis causa grandes pérdidas económicas, que han sido clasificadas en (Kennedy y Benedictus, 2001):

- Gastos directos: son los derivados del sacrificio de los animales en fase clínica (debido a pérdida de la producción de estos animales, gastos veterinarios en el diagnóstico de la enfermedad, pérdida en el valor de las canales en matadero), cuadros subclínicos (con una menor producción lechera, y de menor calidad), problemas asociados (infertilidad, mastitis) e inversiones en programas de control de paratuberculosis.
- Gastos indirectos: originados por restricciones en el mercado y trabas en el transporte de animales enfermos a nivel nacional e internacional (exportación).
- Costes inaparentes: pérdida de potencial genético por sacrificios tempranos y por restricciones en el mercado.

Aunque resulta complejo hacer estimaciones directas del costo total que ocasiona la enfermedad, las mayores diferencias suelen darse en los animales de mayor producción (Benedictus *et al.*, 1987). Las pérdidas en la producción lechera de los animales clínicamente enfermos (de un 5 a un 25% respecto al año anterior), unidas a la mayor tasa de mortalidad y al descenso de peso en el sacrificio, se han estimado en unos 200\$ por animal (Benedictus *et al.*,

1987; Johnson-Ifeorlundu *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1999; Kennedy y Benedictus, 2001; McKenna *et al.*, 2005); en Francia se atribuyó a la aparición de casos positivos unas pérdidas de 1940€ por animal en explotaciones de leche y 1905€ en rebaños de carne, más otros 461€ por cada caso subclínico (Dufour *et al.*, 2004). A nivel estatal, Losinger y colaboradores estimaron unas pérdidas de 200±160 millones de dólares causadas por la paratuberculosis a la economía estadounidense solo debido al descenso en la producción láctea (Losinger, 2005).

Es tal la importancia que está adquiriendo la paratuberculosis que se han puesto en funcionamiento numerosas medidas de control de la enfermedad en vacuno y pequeños rumiantes en países de todo el mundo (Sergeant, 2001; Kovich *et al.*, 2006; McKenna *et al.*, 2006b; Pavlik *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007; Koren, 2007; Khol *et al.*, 2007b).

3.2. Infección y patogenia

La vía principal de adquisición de la enfermedad es la fecal-oral, al ingerir un animal susceptible la micobacteria con el agua, los pastos o, en el caso de animales lactantes, al mamar de las ubres contaminadas con materia fecal (Sweeney, 1996; Whittington y Sergeant, 2001). Se han descrito una serie de factores que determinan la probabilidad de que un animal adquiera la infección y desarrolle la enfermedad: el más importante de todos ellos es la edad, ya que se ha comprobado que los animales jóvenes son más susceptibles a la enfermedad, especialmente en edad neonatal (Hagan, 1938; Larsen *et al.*, 1975; Whittington y Sergeant, 2001; Manning y Collins, 2001). Esto puede ser debido a la inmadurez del sistema inmune de estos animales unida a la especial permeabilidad de la mucosa intestinal durante las primeras horas de vida de los neonatos, lo que permitiría el paso de *Map* (Cocito *et al.*, 1994; Sweeney, 1996). El otro factor determinante para el éxito de la infección es la dosis de *Map*, siendo suficiente una dosis de 10^3 bacilos (Brotherston *et al.*, 1961), lo que representa una cantidad de materia fecal muy pequeña dado el número de bacilos que puede excretar un animal infectado. En animales adultos, más resistentes a la infección, puede hacer falta una dosis más elevada y/o repetida para lograr instaurarse (Larsen *et al.*, 1975). Aunque se ha descrito una cierta susceptibilidad de raza, los resultados podrían deberse a un distinto riesgo de exposición, y por tanto no hay datos concluyentes a ese respecto (Clarke, 1997; Manning y Collins, 2001). Estudios recientes han demostrado una posible asociación entre paratuberculosis y los genes NRAMP1 y CARD15 en vacuno (Pinedo *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007), y NRAMP y genes del complejo mayor de histocompatibilidad en ovino (Reddacliff *et al.*, 2005).

Además de la ruta fecal-oral, se han descrito otras posibles vías de transmisión: los animales infectados pueden excretar *Map* directamente en la leche o el calostro, incluso en ausencia de signos clínicos (Sweeney *et al.*, 1992b; Streeter *et al.*, 1995), constituyendo por tanto una eficiente vía de transmisión para animales en fase lactante (Sweeney, 1996). También se ha comprobado la existencia de transmisión intrauterina, especialmente en animales en fases avanzadas de la enfermedad (Seitz *et al.*, 1989; Sweeney *et al.*, 1992a). Los programas de control de paratuberculosis recomiendan la separación inmediata de las crías tras el parto para evitar que entren en contacto con sus madres en las horas más críticas de susceptibilidad a la infección (Kennedy y Benedictus, 2001), lo que les evitaría tomar calostro infectado. Sin embargo la transmisión intrauterina no suele ser tomada en cuenta, a pesar de que la probabilidad de que se produzca en animales clínicamente infectados es del 20-30% (Whittington y Windsor, 2007), retrasándose por tanto el control o eventual erradicación de la enfermedad (Sweeney, 1996; Whittington y Windsor, 2007). Por último, se ha aislado *Map* a partir de muestras de semen y órganos reproductores procedentes de toros sementales infectados, lo que supondría otra posible vía de contagio (Larsen *et al.*, 1981; Eppleston y Whittington, 2001; Ayele *et al.*, 2004; Khol *et al.*, 2007a). Aunque la posibilidad de que la infección se transmita de forma efectiva por esta vía se considera muy baja (Manning y Collins, 2001), se han desarrollado sistemas de PCR a tiempo real capaces de examinar muestras de semen destinados a inseminaciones artificiales (Herthnek *et al.*, 2006).

Una vez que ha llegado al lumen intestinal *Map* cruza la mucosa y pasa al sistema linfático a través de las células M epiteliales que recubren las placas de Peyer de íleon y yeyuno (Momotani *et al.*, 1988; Stabel, 2000b). Los microorganismos son entonces fagocitados por los macrófagos intraepiteliales y subepiteliales, donde se multiplican intracelularmente (Cocito *et al.*, 1994). La supervivencia intracelular de *Map* en los macrófagos (Zhao *et al.*, 1999) es uno de los puntos clave que determinan el éxito de la infección (Harris y Barletta, 2001), y depende del grado de activación y diferenciación de los mismos, aunque el mecanismo por el cual *Map* sobrevive a este proceso no es del todo conocido (Bannantine y Stabel, 2002). Cuando los macrófagos procesan los microorganismos y presentan los correspondientes antígenos a los linfocitos T se desencadena la respuesta inmune.

De forma similar a lo que sucede en las infecciones por *M. leprae*, *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se pueden distinguir dos fases fundamentales en la respuesta inmune (Manning, 2001): en un primer momento se desencadena una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T *helper* 1 (Th1), en la que se liberan citoquinas proinflamatorias, principalmente Interleuquina-6 (IL-6), IL-2, Interferón-gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Estas sustancias

atraen y activan los macrófagos encargados de destruir las bacterias y evitar la progresión de la infección. Además desencadenan una respuesta inflamatoria que produce la formación de granulomas destinados a aislar los focos de infección (Clarke, 1997; Stabel, 2000b). Esta fase, denominada “tuberculoide” o paucibacilar, se caracteriza por la presencia de un infiltrado tisular formado fundamentalmente por linfocitos y escasas micobacterias. Este periodo coincide con la etapa subclínica de la enfermedad, en la que la infección intracelular queda contenida en granulomas, y puede durar de meses a años, dando lugar al característico largo periodo de incubación (Manning y Collins, 2001).

Sin embargo en fases más avanzadas la respuesta inmune celular disminuye y se produce una respuesta inmune de base humoral, mediada por la secreción de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) por parte de los linfocitos Th2 (Stabel, 2000b; Manning y Collins, 2001; Coussens, 2004). Los anticuerpos producidos durante esta fase no son protectores, con lo que la infección progresa, diseminándose *Map* por el tracto gastrointestinal y otros órganos por vía sanguínea o linfática (Pavlik *et al.*, 2000b; Manning y Collins, 2001; Ayele *et al.*, 2004). En esta etapa, denominada “lepromatosa”, los animales presentan bajas tasas de reactividad a pruebas diagnósticas de inmunidad celular y elevados títulos de anticuerpos; estos animales son los que muestran los signos clínicos inespecíficos que conducen al animal a la muerte en un periodo de semanas o meses. Recientes descubrimientos han cuestionado sin embargo la uniformidad de este patrón de evolución de la enfermedad (primero inmunidad celular y después inmunidad humoral) al detectar algunos tipos de inmunoglobulinas (IgG1, IgG2) en mayores concentraciones en animales en fases subclínicas con respecto a animales con paratuberculosis clínica (Koets *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2003).

3.3. Signos clínicos y lesiones

La paratuberculosis es una enfermedad crónica consuntiva caracterizada por la pérdida de condición corporal progresiva (Chiodini *et al.*, 1984a). A pesar de que se asocia con animales con diarrea, en un mal estado de carnes y próximos a la muerte, lo cierto es que en un rebaño infectado la proporción de animales en fase clínica avanzada de la enfermedad es relativamente reducida (Whitlock y Buergelt, 1996). Antes de llegar a esa fase, podemos distinguir tres etapas previas:

- una fase de infección “silenciosa”, típica de animales jóvenes por debajo de los dos años, en los que no se manifiesta ningún signo clínico aunque pueden estar ya excretando micobacterias al ambiente en pequeñas cantidades. Estos animales resultan muy difíciles de

detectar, ya que solo puede intentarse mediante técnicas de diagnóstico de inmunidad celular, que muestran en general una baja especificidad (Tiwari *et al.*, 2006)

- una fase subclínica, que puede durar hasta varios años. Los principales síntomas que se observan son un descenso de la producción en ganado de leche y en ocasiones alteraciones reproductivas y mastitis, que ocasionan pérdidas económicas (Stabel, 1998; Johnson-Ifeorulundu *et al.*, 1999; Johnson-Ifeorulundu *et al.*, 2000). En ocasiones estos animales son sacrificados por este motivo, con lo que la enfermedad puede estar presente en el rebaño a pesar no haber animales en fases clínicas. Hay una excreción intermitente de micobacterias en las heces, y una proporción de estos animales tienen títulos de anticuerpos detectables (Tiwari *et al.*, 2006)
- Una fase clínica, que aparece después de un periodo de incubación que normalmente dura de 2 a 10 años. Aparecen los signos típicos de la paratuberculosis, tales como la pérdida de peso y una diarrea intermitente, consecuencia del engrosamiento de la pared intestinal que origina un cuadro de malabsorción, si bien ésta no se presenta en todas las especies (Whitlock y Buergelt, 1996; Manning, 2001; Tiwari *et al.*, 2006). Estos animales son fácilmente detectables en cultivos fecales o ELISAs de detección de anticuerpos frente a *Map*.

En la fase clínica avanzada aparecen otros síntomas como hipoproteinemia y edema mandibular, hasta llegar a un punto en el que los animales están tan débiles que no pueden levantarse y mueren en el transcurso de semanas (Clarke, 1997; Manning y Collins, 2001). Sin embargo, la proporción de animales que llegan a esta fase es muy pequeña, ya que en la mayoría de los casos se les sacrifica en alguna de las dos fases anteriores debido a su baja producción (Buergelt y Duncan, 1978). En otras especies animales distintas del vacuno los síntomas pueden reducirse a un adelgazamiento progresivo, que en el caso de especies con capas densas de lana (como ovejas o llamas) puede pasarse por alto hasta fases avanzadas (Manning, 2001).

Las lesiones macroscópicas visibles en la necropsia son, por una parte, las comunes a otras enfermedades consuntivas (ausencia de depósitos grasos, atrofia muscular, edemas...), junto con una afectación más específica del tracto digestivo, concretamente en íleon, yeyuno, válvula ileocecal y linfonodos asociados (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997). Se aprecia un engrosamiento de la mucosa, principalmente en la zona del íleon, que forma gruesos pliegues, adquiriendo un aspecto “cerebroide” (por analogía con las circunvoluciones cerebrales), presentando en ocasiones áreas hemorrágicas (Clarke, 1997). Los linfonodos asociados experimentan un aumento de tamaño y adquieren un aspecto tumefacto, y

en ocasiones se aprecia una linfangiectasia (i.e. dilatación de los vasos linfáticos), si bien esto es más común en pequeños rumiantes. En raras ocasiones hay afectación de otros órganos, aunque se han descrito casos en hígado y corazón (Buergelt *et al.*, 1978; Clarke, 1997). En otras especies animales la paratuberculosis da lugar a cuadros de lesiones similares (Clarke, 1997; Greig *et al.*, 1997).

Mediante un análisis histológico se puede observar una enteritis granulomatosa, cuya lesión más característica es un infiltrado celular formado por macrófagos, linfocitos y células epitelioides en la lámina propia intestinal, que puede afectar a otras capas (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Corpa *et al.*, 2000a). Las lesiones pueden variar mucho dependiendo de la especie afectada, el tipo de cepa, el estado inmunológico y la fase de infección, yendo desde lesiones focales a formas difusas. Se han establecido clasificaciones detalladas en función de la naturaleza, localización, extensión y tipos celulares implicados en bovino (Buergelt *et al.*, 1978; González *et al.*, 2005), ovino (Stamp y Watt, 1954; Rajya y Singh, 1961; Carrigan y Seaman, 1990; Clarke y Little, 1996; Pérez *et al.*, 1996) y caprino (Paliwal y Rajya, 1982; Tafti y Rashidi, 2000; Corpa *et al.*, 2000a). En conjunto podemos hablar de lesiones focales o multifocales localizadas en fases iniciales de la enfermedad, con escasa presencia de micobacterias, que se producen cuando la respuesta inmune es fundamentalmente de base celular; y lesiones difusas o graves, características de fases más avanzadas de la enfermedad cuando el animal tiene altos títulos de anticuerpos, en las que puede haber una alta carga micobacteriana, aunque no en todos los casos (formas paucibacilares). Se han descrito distintos perfiles de secreción de citoquinas asociados a formas multibacilares y paucibacilares en casos de paratuberculosis ovina (Smeed *et al.*, 2007).

3.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la paratuberculosis se basa fundamentalmente en dos herramientas: la demostración de la presencia del agente (mediante cultivo bacteriológico o detección de su ADN) y la detección de la respuesta inmune desencadenada por la infección. El diagnóstico clínico se ve complicado por la inespecificidad de la sintomatología, si bien la aparición de cuadros compatibles en varios animales con edades de 2 a 4 años, y normalmente coincidentes con periodos de estrés, pueden hacer sospechar de un caso de paratuberculosis; por otra parte, el diagnóstico anatómo-patológico solo puede hacerse *post-mortem*, aunque tiene la ventaja de que puede detectar animales en fases subclínicas, con lesiones focales (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a).

3.4.1. Detección del microorganismo

3.4.1.1. Cultivo bacteriológico.

El diagnóstico bacteriológico es el más específico, y debe emplearse siempre para la confirmación de la infección en un rebaño, pero es poco sensible y requiere bastante tiempo (Stabel, 1998). Sin embargo, se sigue considerando el método de referencia para el diagnóstico de paratuberculosis, y en general es más sensible que la histopatología (Whittington y Sergeant, 2001; Martínson *et al.*, 2008). Las muestras de elección son válvula ileocecal y linfonodo ileocecal o, en el caso de animales vivos, muestras fecales, si bien el uso de éstas disminuye la sensibilidad del cultivo en todas las especies ya que solo detecta animales excretadores, y son muestras más susceptibles de contaminarse (Whitlock y Buergelt, 1996; Whittington *et al.*, 1999; Pavlik *et al.*, 2000b; Whittington y Sergeant, 2001; Huntley *et al.*, 2005). De cualquier forma, el cultivo fecal es una buena alternativa diagnóstica *in vivo*, ya que detecta animales en fases más tempranas que el ELISA y puede complementar a éste (Whitlock *et al.*, 2000; Gasteiner *et al.*, 2000; Eamens *et al.*, 2000). Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes que plantea el uso rutinario del cultivo fecal como técnica diagnóstica de paratuberculosis es su elevado coste económico; para disminuir dicho coste, derivado de la realización de cultivos fecales individuales en todo un rebaño, se ha evaluado la posibilidad de procesar muestras de distintos animales juntas en una mezcla (*pooled fecal culture*) en bovino y ovino, concluyéndose que proporciona una aceptable sensibilidad y rebaja mucho los costes (Whittington *et al.*, 2000a; Wells *et al.*, 2002; Sergeant *et al.*, 2002).

Los medios de cultivo sólidos más empleados son los basados en yema de huevo [Herrold's Egg Yolk Medium, HEYM (Merkal *et al.*, 1964) y Lowëstein-Jensen, LJ (Jorgensen, 1982)], en suero [Dubos, (Saxegaard, 1985)] y los medios sintéticos [Middlebrook, (Merkal y Curran, 1974)]; todos ellos llevan normalmente incorporada la micobactina J (Merkal y McCulloch, 1982), necesaria para el primo-aislamiento de la mayoría de aislados (ver *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, pág 17). Algunas cepas de *Map* resultan más difíciles de cultivar en el laboratorio, en especial las pertenecientes a los tipos I y III, por lo que resulta de crucial importancia la elección de los medios de cultivo más apropiados (Juste *et al.*, 1991; Whittington *et al.*, 1999; de Juan *et al.*, 2006b; Gumber y Whittington, 2007; Cernicchiaro *et al.*, 2008). *Map* se caracteriza por tener una velocidad de crecimiento *in vitro* extremadamente lenta, por lo que el tiempo necesario para obtener un cultivo positivo puede oscilar entre las tres semanas y más de un año, especialmente en el caso de cepas de tipo I y III (Chiodini *et al.*, 1984a; Whittington y Sergeant, 2001; de Juan *et al.*, 2006b).

En los últimos años, gracias a la puesta a punto de sistemas automáticos de cultivo líquido, se ha podido reducir sensiblemente ese lapso de tiempo, incrementándose también en cierta medida la sensibilidad de la técnica de cultivo. El primero que se utilizó con aislados de *Map* fue el sistema radiométrico BACTEC 460 system (Becton Dickinson inc.), un medio líquido Middlebrook 7H12 que detecta las variaciones en las concentraciones de CO₂ producto de la respiración bacteriana mediante un sistema de detección de ¹⁴C; este sistema se empleó en primer lugar para el aislamiento de micobacterias patógenas humanas y luego fue adaptado para el aislamiento de *Map* añadiéndole al medio de cultivo antibióticos, antifúngicos, micobactina J y yema de huevo (Damato *et al.*, 1982; Damato *et al.*, 1987; Damato y Collins, 1990; Collins *et al.*, 1990b; Whittington *et al.*, 1999). Otros sistemas automatizados no radiométricos empleados para el aislamiento de *Map* son el MGIT (Becton Dickinson Inc.) (Schwartz *et al.*, 2000), el TREK ESP (Trek Diagnostics Inc. Ohio, EEUU) (Shin, 2000) y el ROCHE MB check system (Becton Dickinson Inc.) (Ridge, 1993).

Los inconvenientes de estos sistemas de cultivo respecto al cultivo tradicional en medios sólidos son su mayor tasa de contaminación, su elevado coste económico y la necesidad de identificar posteriormente el crecimiento obtenido en el medio líquido, ya sea mediante métodos moleculares (más rápido, pero más caro) o haciendo un subcultivo en medio sólido (más barato, pero más lento) (Whittington *et al.*, 1999).

3.4.1.2. Detección de ADN

Una alternativa diagnóstica al cultivo mucho más rápida es la detección de secuencias específicas del ADN de *Map* directamente sobre las muestras clínicas, lo que implica su presencia en dicha muestra. Esta detección puede llevarse a cabo mediante técnicas de hibridación *in situ* (Hulten *et al.*, 2000a; Hulten *et al.*, 2000b; Sechi *et al.*, 2001; Hulten *et al.*, 2001; Jeyanathan *et al.*, 2006), PCRs directas (detalladas más adelante) o incluso una combinación de ambas (Sanna *et al.*, 2000). Sin duda el método más extendido ha sido el de la PCR directa a partir de muestras clínicas, normalmente dirigida hacia el elemento IS900 (Green *et al.*, 1989) por encontrarse repetido en el genoma de *Map* de 14 a 18 veces (Bull *et al.*, 2000a), lo que hace que disminuya su umbral de detección en comparación con genes presentes en una sola copia; pero también se han diseñado otros sistemas dirigidos a diversas secuencias del ADN de *Map*, como el f57 (pág. 19) (Tasara y Stephan, 2005; Bosshard *et al.*, 2006). Tras la aplicación de distintos métodos de extracción de ADN, la PCR directa se ha utilizado en muestras fecales (Vary *et al.*, 1990; Garrido *et al.*, 2000; Marsh *et al.*, 2000; Marsh y Whittington, 2001; Paolicchii *et al.*, 2003; Eamens *et al.*, 2007; Kawaji *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007a), muestras de tejidos

(Gwozdz *et al.*, 1997; Gwozdz *et al.*, 2000c; Vansnick *et al.*, 2007) y muestras de leche (Millar *et al.*, 1996; Giese y Ahrens, 2000; Grant *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2001; Odumeru *et al.*, 2001; Pillai y Jayarao, 2002; Grant *et al.*, 2002a; Paolicchii *et al.*, 2003; Tasara y Stephan, 2005; Bosshard *et al.*, 2006; Donaghy *et al.*, 2008). Otra muestra empleada para la realización de PCRs directas ha sido la sangre, aunque con resultados contradictorios en cuanto a su sensibilidad (Gwozdz *et al.*, 1997; Gwozdz *et al.*, 2000c; Naser *et al.*, 2004; Juste *et al.*, 2005; Bhide *et al.*, 2006).

Los inconvenientes fundamentales que presentan las técnicas de PCR directa sobre muestras clínicas son la presencia de inhibidores de la PCR en las propias muestras (especialmente en las de heces) (Vary *et al.*, 1990; Garrido *et al.*, 2000; Eamens *et al.*, 2007) y la imposibilidad de demostrar la viabilidad de las bacterias: esto es de gran importancia en el caso de PCRs directas realizadas en muestras de leche, ya que para confirmar la presencia de bacterias viables es imprescindible realizar además un cultivo bacteriológico (Grant *et al.*, 2002a). También resulta de gran importancia la optimización del método de extracción de ADN aplicado (Chui *et al.*, 2004). Aun así, aunque resulta difícil que puedan sustituir al cultivo como prueba diagnóstica de referencia, estas técnicas han demostrado una indudable eficacia como métodos complementarios para incrementar la sensibilidad.

3.4.2. Detección de la respuesta inmune del hospedador

La detección de la respuesta inmune desencadenada en el hospedador por la infección de *Map* es la base de todas las pruebas de diagnóstico inmunológico. Como ya se ha mencionado, en la paratuberculosis hay una primera fase en la que la respuesta inmune tiene un componente celular, mientras que en fases más avanzadas éste disminuye y se produce una respuesta humoral (ver pág. 27).

Las **pruebas de detección de la respuesta inmune celular** son fundamentalmente dos: la intradermorreacción y el test de Interferón-gamma (IFN- γ).

- Intradermorreacción: al igual que sucede en el caso de la tuberculosis (pág. 55), esta prueba mide la hipersensibilidad retardada producida al inyectarle a un animal un extracto de *Map* (Johnina) o *M. avium* (PPD aviar, más fácil de producir) y medir posteriormente el incremento observado en el grosor de la piel (Chiodini *et al.*, 1984a; Cocito *et al.*, 1994; Harris y Barletta, 2001). Debido a su baja sensibilidad y especificidad (producto de reacciones cruzadas con micobacterias ambientales) actualmente está en desuso (Collins, 1996).

- Test de IFN- γ : este test, adaptación del empleado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, mide la producción *in vitro* de IFN- γ por los linfocitos ante la estimulación con un derivado proteico purificado (PPD), normalmente elaborado a partir de una cepa de *Map*, (johnina) (Billman-Jacobe *et al.*, 1992). Demuestra una mayor sensibilidad que las pruebas serológicas en la detección de animales en fases subclínicas de la enfermedad, y ha sido utilizado en varios ensayos (Stabel, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000b). Sin embargo, su sensibilidad es mucho menor en poblaciones de animales en la etapa clínica de la enfermedad (Stabel, 1996), y su especificidad ha resultado insuficiente en algunas pruebas de campo (McDonald *et al.*, 1999); otros autores atribuyen esa baja especificidad al uso de animales infectados (falsos negativos en el cultivo) como controles negativos, y obtienen mejores valores al analizar rebaños libres de paratuberculosis (Kalis *et al.*, 2003). La aparente falta de especificidad también se explicaría por la detección de animales que, aunque infectados, superaron dicha infección, o de animales expuestos (y por tanto sensibilizados) pero no infectados (Robbe-Austerman *et al.*, 2006b). Sin embargo, experimentalmente no se obtuvieron animales positivos al exponerlos por vía oral o nasal a concentraciones de bacilos paratuberculosos muertos (Robbe-Austerman *et al.*, 2007). Para aumentar la sensibilidad de la prueba también se ha ensayado con inyecciones intradérmicas de johnina previas a la extracción de sangre (Stabel *et al.*, 2007).

Por otra parte, las **pruebas de detección de la inmunidad humoral** se basan en la detección de los anticuerpos producidos como respuesta a la infección por *Map*, que como ya se ha dicho, se producen en fases avanzadas de la enfermedad. Por lo tanto, el mayor inconveniente común a todas estas pruebas es su baja sensibilidad en la detección de animales en fases tempranas de la enfermedad (Harris y Barletta, 2001). Se han utilizado tres pruebas para el diagnóstico de la paratuberculosis:

- la inmunodifusión en gel de agar (AGID, *Agar Gel Immunodiffusion test*) se basa en la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo al poner en contacto un suero problema con un antígeno seleccionado en un gel de agar (Sherman *et al.*, 1984). Presenta una buena especificidad pero una baja sensibilidad, por debajo de la obtenida mediante la técnica de ELISA (Sherman *et al.*, 1989; Sherman *et al.*, 1990; McNab *et al.*, 1991; Paolicchii *et al.*, 2003; Whittington *et al.*, 2003a; Gumber *et al.*, 2006), siendo además una técnica más laboriosa; sin embargo, en estudios en ovino se ha destacado la complementariedad de ambas pruebas, ya que detectaron subpoblaciones distintas de animales infectados (Hope *et al.*, 2000; Gumber *et al.*, 2006; Robbe-Austerman *et al.*,

2006a). Su uso es recomendable para la confirmación del diagnóstico en animales con sintomatología clínica (Cocito *et al.*, 1994; Dubash *et al.*, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000b).

- La fijación del complemento (FC, *Complement Fixation test*) fue un test muy utilizado en el pasado, y aún es una prueba requerida en la exportación internacional de ganado (Cocito *et al.*, 1994; Manning y Collins, 2001). Ha demostrado una aceptable especificidad pero una baja sensibilidad, y en la actualidad es el menos utilizado dadas sus bajas prestaciones en comparación con el AGID y el ELISA y su laboriosidad y subjetividad (de Lisle *et al.*, 1980; McNab *et al.*, 1991; Sockett *et al.*, 1992; Collins, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000b).
- La prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) es la prueba de detección de anticuerpos más extendida en la actualidad en el diagnóstico de paratuberculosis (y de muchas otras enfermedades). Presenta varias ventajas prácticas, tales como su automatización, su repetitibilidad, la interpretación objetiva de sus resultados, la posibilidad de analizar un número elevado de muestras en poco tiempo y la capacidad de modificar el punto de corte en función de la mayor sensibilidad o especificidad deseada (Manning y Collins, 2001; Sergeant *et al.*, 2003; Whittington *et al.*, 2003a; Gumber *et al.*, 2006). Además puede emplearse para analizar muestras de leche (Sweeney *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 2005; van Weering H. *et al.*, 2007), y se ha ido adaptando a distintas especies además de los rumiantes domésticos (Kramsky *et al.*, 2000; Manning, 2001; Griffin *et al.*, 2005). Para incrementar su sensibilidad y especificidad normalmente se incluye un paso de preadsorción con antígenos de *Mycobacterium phlei* para eliminar anticuerpos inespecíficos que podrían dar lugar a reacciones cruzadas (Milner *et al.*, 1987; Harris y Barletta, 2001; Manning y Collins, 2001). Es más sensible que las dos anteriores (Collins, 1996), aunque como ya se ha citado hay una cierta complementariedad entre el AGID y el ELISA, ya que no detectan los mismos animales infectados (ver AGID). Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba en relación al cultivo es, como ha quedado descrito, limitada en la detección de animales en fases tempranas de la enfermedad (por debajo del 50% y en ocasiones hasta del 30%), siendo mucho más sensible en animales excretores (Sockett *et al.*, 1992; Sweeney *et al.*, 1995; Dargatz *et al.*, 2001a; McKenna *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005). Sin embargo en un estudio longitudinal el incremento en los valores del ELISA por debajo del punto de corte no resultó ser un indicador válido en la predicción del estado infeccioso del animal (Sweeney *et al.*, 2006). Todos estos resultados indican que, aun siendo el ELISA una herramienta imprescindible en los programas de control de paratuberculosis, el cultivo bacteriológico continúa siendo la prueba de referencia en el diagnóstico de la enfermedad. De cualquier forma, el

descubrimiento de la producción de ciertos anticuerpos en fases más tempranas de la enfermedad (Koets *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2003), así como la elección de nuevos antígenos más sensibles y específicos están permitiendo el diseño de nuevos ELISAs experimentales con superiores valores de sensibilidad y especificidad (Paustian *et al.*, 2004; Griffin *et al.*, 2005; Eda *et al.*, 2006; Speer *et al.*, 2006).

3.5. Tratamiento y control

3.5.1. Tratamiento.

Actualmente no hay ningún tratamiento aplicable a animales de producción, ya que el costo de éste sería inasumible, y precisaría de una pauta de administración diaria durante mucho tiempo (Emery y Whittington, 2004). Estudios *in vitro* han demostrado que *Map* es sensible a varios antibióticos, entre los que destacan claritromicina, estreptomina, ciprofloxacina, rifabutina y amikacina, obteniéndose resultados contradictorios con el etambutol (Chiodini *et al.*, 1984c; Chiodini, 1990; Rastogi *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1999), aunque posteriores estudios han revelado una mayor resistencia a la claritromicina (Zanetti *et al.*, 2006). Recientemente se ha comprobado que algunos medicamentos inmunosupresores, aplicados en medicina humana en la enfermedad de Crohn, también tienen una actividad *in vitro* frente a *Map* (Greenstein *et al.*, 2007; Collins y Shin, 2007). Sin embargo, aunque la aplicación de tratamientos experimentales basados en éstos y otros antibióticos lograron atenuar el cuadro clínico y las lesiones observadas en la necropsia en varias experiencias, no consiguieron eliminar la infección, manteniéndose por tanto los animales como posibles fuentes de *Map* (Merkal y Larsen, 1973; Slocombe, 1982; St-Jean y Jernigan, 1991; Brumbaugh *et al.*, 2000). La explicación de la ineficacia de los tratamientos *in vivo* se ha atribuido en parte a la naturaleza de patógeno intracelular de *Map*, lo que haría que los antibióticos no pudieran ejercer su efecto (Cocito *et al.*, 1994). Para que el tratamiento fuera una opción viable sería necesario el empleo de quimioterápicos capaces de penetrar en los macrófagos, y cuyo coste fuera asumible por parte de los propietarios de los animales (Harris y Barletta, 2001). Se ha especulado con la posible aplicación de virus bacteriófagos frente a *Map* como una alternativa, pero de momento no hay datos experimentales que avalen la utilidad de esa estrategia (Emery y Whittington, 2004). De momento, el empleo de antibióticos sólo puede plantearse en el caso de animales de un elevado valor genético con fines reproductivos, y siempre valorando el riesgo de estar manteniendo un posible foco de infección (St-Jean G., 1996; Harris y Barletta, 2001).

3.5.2. Medidas de manejo.

Dada la inexistencia de estrategias terapéuticas válidas, la lucha frente a la paratuberculosis debe centrarse en el control de la enfermedad con vistas a una eventual erradicación. Todos los programas de control deben ir encaminados a la disminución de nuevos casos de infección y a la eliminación de los animales enfermos excretores del agente infeccioso con el fin de eliminar las fuentes de infección de una explotación (Whittington y Sergeant, 2001; McKenna *et al.*, 2006a). En el caso de la paratuberculosis, la detección de las fuentes de infección es muy complicada debido al largo periodo de incubación de la enfermedad y la elevada proporción de animales en fases subclínicas (y por tanto difíciles de detectar) existente en un rebaño infectado; estos animales pueden excretar grandes dosis de micobacterias al ambiente, creando por tanto una situación idónea para la infección de nuevos individuos susceptibles (Kennedy y Benedictus, 2001). Se han descrito una serie de medidas de manejo críticas relacionadas con la reposición para disminuir la prevalencia de paratuberculosis en una explotación (Collins *et al.*, 1994; Wells y Wagner, 2000b; Harris y Barletta, 2001; McKenna *et al.*, 2006a):

- limpieza y desinfección de las naves, especialmente de las de maternidad
- Separación inmediata de las crías recién nacidas de sus madres después del parto
- Uso de calostro artificial o calostro de madres negativas; limpieza de las ubres antes de la recolección del calostro
- En fases posteriores, empleo de leche pasteurizada o leche en polvo
- Separación de animales adultos y crías durante su primer año de vida
- Utilización de diferente equipamiento para el manejo de los residuos y de la alimentación
- No reutilizar las deposiciones de animales adultos como abono para campos cuya producción se utilice en animales jóvenes

En otro estudio, empleando una aproximación Bayesiana, Nielsen y colaboradores identificaron varios factores de riesgo estadísticamente significativos en el área de los terneros en explotaciones danesas de producción lechera (Nielsen y Toft, 2007b): la limpieza en la zona de alimentación, la cantidad de paja en las camas, el tipo de alojamiento y la densidad de animales.

Por otra parte, en lo relativo a la eliminación de animales infectados de la explotación, las medidas recomendadas son el control de los animales adultos mediante tests diagnósticos (fundamentalmente ELISA y cultivo de muestras de heces) y el sacrificio inmediato de los animales con signos clínicos compatibles con paratuberculosis y/o cultivo fecal positivo (Kennedy y Benedictus, 2001; McKenna *et al.*, 2006a). Para disminuir el coste de la monitorización del rebaño pueden realizarse cultivos fecales de varios animales (ver diagnóstico bacteriológico, pág. 31) o realizar muestreos ambientales para determinar la carga de contaminación en distintas áreas (Raizman *et al.*, 2004).

Todas estas medidas están encaminadas a la ruptura del ciclo de transmisión de la paratuberculosis entre animales infectados excretores (normalmente en fases subclínicas) y animales susceptibles (normalmente crías en edad lactante) (Whittington y Sergeant, 2001). Para impedir la reintroducción de la enfermedad en una explotación es importante el control en la incorporación de animales nuevos y la separación de granjas colindantes, evitando en la medida de lo posible la utilización de pastos comunes (Kennedy y Benedictus, 2001). Sin embargo, los programas de control se ven lastrados por la falta de sensibilidad a nivel individual de las técnicas diagnósticas disponibles en este momento (Harris y Barletta, 2001; Kennedy y Benedictus, 2001).

3.5.3. Vacunación.

Como herramienta suplementaria a las medidas de control se ha recurrido en ocasiones a la vacunación, empleando vacunas vivas atenuadas o inactivadas. Desde la primera aplicación con una cepa atenuada (Vallée y Rinjard, 2008) se han realizado numerosos estudios en todas las especies de rumiantes domésticos, y en todos los casos se obtuvieron similares resultados: la aplicación de las vacunas produjo una reducción en la sintomatología de los animales infectados, disminuyendo por tanto las pérdidas económicas producidas por la enfermedad; y los animales vacunados también eliminaron menores tasas de *Map* al ambiente, contribuyendo por tanto al descenso de la carga ambiental de la bacteria [entre los más recientes (Kormendy, 1994; Wentink *et al.*, 1994; van Schaik G. *et al.*, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000a; Corpa *et al.*, 2000b; Reddacliff *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2007; Patton *et al.*, 2007)]; algunos inconvenientes menores descritos en estudios de vacunación son una mayor relajación respecto al mantenimiento de las medidas de manejo en explotaciones aplicando pautas de vacunación por una excesiva confianza en el efecto de la vacuna (Kalis *et al.*, 2001); la aparición de lesiones en el punto de inoculación de la vacuna (Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor y Eppleston, 2006), si bien son mínimas si se administra correctamente (Eppleston y Windsor, 2007); y el riesgo de

autoinoculaciones accidentales para el personal veterinario (Windsor *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2005). Sin embargo, hay dos problemas asociados a la vacunación frente a paratuberculosis de mucha mayor importancia: en primer lugar, en ningún caso previno la infección por *Map*, manteniéndose por tanto ésta en el rebaño, y los animales vacunados continuaron excretando la bacteria al ambiente (Kalis *et al.*, 2001). En segundo lugar, se ha descrito una interferencia provocada por la vacunación con las pruebas de diagnóstico de paratuberculosis (Spangler *et al.*, 1991; Kormendy, 1994; Kohler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002) y tuberculosis (Aranaz *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002).

Por todo lo anterior, aun disminuyendo las manifestaciones clínicas de la enfermedad y las pérdidas económicas derivadas de ésta, la vacunación no es una estrategia compatible con la erradicación de la paratuberculosis (Cocito *et al.*, 1994; Harris y Barletta, 2001; Kennedy y Benedictus, 2001; Emery y Whittington, 2004). En países actualmente con programas de erradicación de tuberculosis los problemas de interferencia diagnóstica son especialmente graves, y solo serían evitables con el desarrollo de vacunas que permitieran la diferenciación entre animales vacunados de infectados (Muskens *et al.*, 2002).

3.5.4. Persistencia en el ambiente

Otro factor que dificulta el diseño de los planes de control y erradicación frente a la paratuberculosis es la capacidad de *Map* para mantener su viabilidad en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo. En este sentido, se ha aislado a partir de muestras ambientales procedentes de granjas infectadas de paratuberculosis, encontrándose una correlación entre la cantidad de muestras positivas y el número de animales seropositivos a paratuberculosis (Berghaus *et al.*, 2006). Del mismo modo, el grado de positividad de las muestras ambientales recogidas en zonas de almacenamiento de deposiciones, los pasillos de los establos y las aguas de escorrentía de varias granjas se relacionó con la prevalencia de paratuberculosis determinada mediante cultivos fecales. Whittington y colaboradores realizaron muestreos ambientales en explotaciones sometidas a vacío sanitario concluyendo que cinco meses después de la eliminación de los animales infectados la probabilidad de aislar *Map* en el ambiente era muy baja, aunque se encontraron algunos cultivos positivos (Whittington *et al.*, 2003b). Estudios experimentales realizados a mitad del siglo pasado demostraron que el agente de la paratuberculosis puede persistir durante más de 17 meses en agua de grifo, pero durante menos de un mes en materia fecal mezclada con orina bovina, y que se veía afectado por el efecto de la luz solar, aunque la congelación a -14°C durante periodos superiores a 5 meses no impedía su crecimiento posterior (Larsen *et al.*, 1956). También se demostró que podía

sobrevivir en heces bovinas contaminadas hasta 246 días (Lovell *et al.*, 1944). Posteriormente Jorgensen y colaboradores estimaron el tiempo de supervivencia de *Map* en una mezcla de estiércol bovino y porcino en 252 días a 5°C y en 168 a 15°C (Jorgensen, 1977).

Un estudio más reciente valorando el tiempo de supervivencia de *Map* en materia fecal contaminada determinó éste en 55 semanas en muestras conservadas a la sombra, siendo mucho menor en muestras expuestas al sol; la humedad no se consideró un factor determinante (Whittington *et al.*, 2004). Además, el microorganismo sobrevivió hasta 24 semanas en la hierba crecida a partir de abono procedente de heces contaminadas en condiciones de sombra, y hasta 9 semanas si se sometía a un 70% de sombra. Para almacenar los residuos orgánicos generados diariamente en una explotación el método más eficaz para eliminar el microorganismo fue la formación de abono, debido a las altas temperaturas generadas en este proceso (Grewal *et al.*, 2006)

Otro factor que influye en la supervivencia de *Map* en el ambiente es la naturaleza del suelo (Johnson-Ifearegulu y Kaneene, 1997; Reviriego *et al.*, 2000; Ward y Pérez, 2004; Dhand *et al.*, 2007), asociándose su presencia con pHs ácidos (Johnson-Ifearegulu y Kaneene, 1999). *Map* también puede ser vehiculado por invertebrados, como demostraron Fischer y colaboradores al aislarlo a partir de muestras de moscas y lombrices procedentes de mataderos y de granjas infectadas de paratuberculosis, y lograr infecciones experimentales en escarabajos (Fischer *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 2005). Incluso los protozoos pueden constituir un reservorio de *Map*, ya que recientemente se ha logrado la ingestión de la bacteria por algunos (*Acanthamoeba polyphaga* y *A. castellanii*) de forma experimental, creando un ambiente que le permite ser más resistente a tratamientos químicos como la cloración (Whan *et al.*, 2006; Mura *et al.*, 2006). En el laboratorio también se comprobó un cierto efecto de ciclos de UV sobre *Map*, mientras que el dióxido de cloro mostró un fuerte poder inactivador (Beran *et al.*, 2007).

Por último, también se ha demostrado la capacidad de *Map* de persistir en el agua de ríos y estanques: Pickup y colaboradores demostraron la presencia de la bacteria en el agua del río Taff, en Gales, en el 32% de las muestras mediante PCR para la detección de IS900 y en el 12.5% mediante cultivo directo (Pickup *et al.*, 2005). También demostraron la presencia de aislados viables después de 632 días en agua de lago. Por su parte, Whittington y colaboradores comprobaron que *Map* sobrevivía hasta 48 semanas en muestras de agua y sedimentos de un estanque mantenidas a la sombra, concluyendo que el agua podía constituir un importante reservorio de infección (Whittington *et al.*, 2005).

En algunos de estos experimentos el cultivo de aislados de *Map* de muestras de agua y del ambiente a lo largo del tiempo dio resultados inconstantes (cultivos negativos sucesivos seguidos de cultivos positivos), lo que permitió especular con la posibilidad de que la bacteria pueda entrar en un estado de latencia en ausencia de nutrientes (Whittington *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 2005; Rowe y Grant, 2006). Whittington y colaboradores detectaron en el genoma de *Map* secuencias homólogas a otras implicadas en la inducción de este fenómeno en *M. smegmatis* (secuencia codificante de la proteína *dps-like*) y *M. tuberculosis* (gen *relA*), aportando evidencias indirectas de ello (Whittington *et al.*, 2004). Estudios comparativos recientes realizados en aislados de *Map* revelaron la expresión de ciertas proteínas en condiciones de ausencia de oxígeno y nutrientes, en lo que puede ser un nuevo camino para comprender como logra la bacteria la supervivencia durante largos periodos de tiempo (Gumber *et al.*, 2007)

3.6. Paratuberculosis en animales de vida salvaje

Aunque la paratuberculosis es una enfermedad propia de los rumiantes domésticos, donde causa el mayor impacto económico, su agente causal ha sido aislado de un rango cada vez mayor de hospedadores, incluyendo incluso especies no rumiantes.

La paratuberculosis presenta una gran importancia, creciente en las últimas décadas, en la familia *Cervidae* (cérvidos). Ha sido detectada con prevalencias variables en poblaciones salvajes de cérvidos en Estados Unidos [ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Chiodini y Van Kruiningen, 1983; Shulaw *et al.*, 1986; Raizman *et al.*, 2005), ciervo de Virginia (*Odocoileus virginianus clavium*) (Quist *et al.*, 2002), uapití (*Cervus elaphus nannodes*) (Cook *et al.*, 1997; Manning *et al.*, 2003), y ciervo sika (*Cervus nipon*) (Temple *et al.*, 1979)] y Europa [ciervo europeo (*Cervus elaphus hippelaphus*) (Nebbia *et al.*, 2000), corzo (*Capreolus capreolus*) (Pavlik *et al.*, 2000a; Machackova *et al.*, 2004)], y se está convirtiendo en una enfermedad relevante en granjas de ciervo común (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*) en Nueva Zelanda ((de Lisle *et al.*, 1993; de Lisle *et al.*, 2006)), Estados Unidos (Manning *et al.*, 1998), Reino Unido (Fawcett *et al.*, 1995), Irlanda (Power *et al.*, 1993), Bélgica (Godfroid *et al.*, 2000), Alemania (Commichau, 1982), República Checa (Pavlik *et al.*, 2000a; Machackova *et al.*, 2004) y España (Marco *et al.*, 2002; Reyes-García *et al.*, 2008)]. En el único estudio realizado en nuestro país al respecto al comenzar esta tesis se detectó la infección por paratuberculosis en una población de gamos (*Dama dama*) situada en la reserva regional de caza de El Sueve (Asturias) (Marco *et al.*, 2002). La presencia de ocho animales con signos clínicos sospechosos (diarrea) condujo al sacrificio y toma de muestras para el diagnóstico de paratuberculosis: el examen histopatológico reveló la

presencia de lesiones compatibles con paratuberculosis en cinco de ellos, y en dos se confirmó la infección mediante el cultivo bacteriológico del agente. Sin embargo la realización de un ELISA y de un test de AGID en 33 individuos (incluyendo los ocho animales con sintomatología) dio resultados negativos en todos ellos, indicando la poca fiabilidad de las pruebas de detección de respuesta inmune en ciertos casos, especialmente en especies no domésticas. La presencia de rumiantes domésticos con paratuberculosis en la zona fue apuntada como una posible fuente de infección para la población de gamos.

En estas especies da lugar a una enfermedad similar a la que produce en los rumiantes domésticos, pero con un curso clínico mucho más rápido, que puede producir el debilitamiento y la muerte de animales por debajo de un año de edad (Manning *et al.*, 1998; Mackintosh *et al.*, 2002). La epidemiología en estas especies es similar a la ya descrita, con una transmisión fecal-oral y siendo los animales recién nacidos los más susceptibles, aunque se ha descrito una tasa de transmisión intrauterina y de excreción en leche superior a la observada en ganado vacuno (van Kooten *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007). Aunque se han descrito infecciones naturales por cepas de tipo I y II (de Lisle *et al.*, 1993; de Lisle *et al.*, 2006) hay evidencias experimentales de que los aislados bovinos presentan una mayor virulencia (O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007).

Otras especies rumiantes de vida salvaje de las que se ha aislado *Map* son cabras alpinas (*Capra ibex*) (Ferroglia *et al.*, 2000), muflones (*Ovis musimon*) (Pavlik *et al.*, 2000a; Machackova *et al.*, 2004), cabras de las rocosas (*Oreamnos americanus*), muflón de las rocosas (*Ovis canadensis*) (Williams *et al.*, 1979), llamas (*Lama glama*) (Belknap *et al.*, 1994), alpacas (*Lama pacos*) (Ridge *et al.*, 1995), guanacos (*Lama guanicoe*) (Salgado *et al.*, 2007) y bisontes (*Bison bison*) (Buergelt *et al.*, 2000; Buergelt y Ginn, 2000; Huntley *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005b), entre otras, concluyéndose que el microorganismo puede infectar cualquier especie de rumiante con la excepción hasta ahora de los jiráfidos (Manning, 2001)

Un exhaustivo trabajo realizado sobre poblaciones de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) en Escocia reveló la presencia de lesiones compatibles con paratuberculosis en órganos de estos animales (Angus, 1990), y estimó después una prevalencia de la enfermedad del 67% en algunas áreas cercanas a granjas con paratuberculosis (Greig *et al.*, 1997), aunque estimaciones posteriores la rebajaron alrededor del 30% (Judge *et al.*, 2006). Una comparación mediante técnicas de caracterización molecular (PFGE y RFLP-IS900) de aislados de vacas y conejos determinó que ambas especies compartían cepas, planteando la hipótesis de una transmisión interespecífica de *Map* (Greig *et al.*, 1999), posibilidad que fue demostrada experimentalmente

(Beard *et al.*, 2001b). Estudios sobre los hábitos de ambas especies determinaron que los conejos son en efecto una posible fuente de infección para el ganado a través de la contaminación de los pastos con sus heces (Daniels *et al.*, 2003a; Daniels *et al.*, 2003b; Daniels *et al.*, 2003c; Daniels *et al.*, 2003d; Judge *et al.*, 2005). En los estudios descritos no se observaron lesiones asociadas al cultivo de *Map* en el conejo, planteando la duda de si la bacteria causa alguna sintomatología en esta especie. La transmisión intraespecífica por vía intrauterina resultó poco probable, por lo que la infección puede mantenerse en estas poblaciones a través de una transmisión horizontal (fecal-oral o sexual) (Judge *et al.*, 2006). Un estudio realizado en Minnesota (EEUU) en conejos de florida (*Sylvilagus floridanus*) de áreas cercanas a explotaciones ganaderas reveló una situación epidemiológica distinta, ya que la prevalencia estimada mediante cultivo de heces fue muy baja (Raizman *et al.*, 2005).

De forma puntual también se ha cultivado *Map* de otras especies de vida salvaje mamíferas no rumiantes, entre ellas el zorro (*Vulpes vulpes*), coyote (*Canis latrans*), tejón (*Meles meles*), armiño (*Mustela erminea*), comadreja (*Mustela nivelas*), hurón (*Mustela putorius furo*), oso pardo (*Ursus arctos*), rata (*Rattus norvegicus*) y ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), liebre (*Lepus europaeus*), mapache (*Procyon lotor*), armadillo (*Dasypus novemcinctus*), gato salvaje (*Felis catus*), zarigüeya (*Didelphis virginiana*), musaraña (*Blarina brevicauda*), mofeta (*Mephitis mephitis*) y jabalí (*Sus scrofa*) (Beard *et al.*, 2001a; Machackova *et al.*, 2003; de Lisle *et al.*, 2003; Corn *et al.*, 2005; Kopecna *et al.*, 2006; Florou *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2007). Se ha aislado también de varias especies de aves, concretamente de córvidos [cuervo (*Corvus corone*), graja (*Corvus frugileus*) y grajilla (*Corvus monedula*)], estornino (*Sturnus vulgaris*), gorrión (*Passer domesticus*) y agachadiza común (*Gallinago gallinago*) (Beard *et al.*, 2001a; Corn *et al.*, 2005). Se ha comprobado experimentalmente su capacidad de infectar otras especies, como el cerdo (Larsen *et al.*, 1971). Por último, se ha cultivado de varias especies de primates: en mandril (*Papio sphinx*) (Zwick *et al.*, 2002), en macacos rabones (*Macaca arctoides*) (McClure *et al.*, 1987) y en macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Pitcock y Gisler, 1961).

Con la excepción de los rumiantes (especialmente cérvidos, en granjas o parques naturales) la paratuberculosis no parece suponer un problema clínico importante en la mayoría de las especies de vida salvaje de las que se ha aislado, y normalmente se han observado unas prevalencias muy bajas (con la excepción de las poblaciones de conejos en Escocia). Sin embargo la importancia de la capacidad de *Map* de infectar tan amplio rango de hospedadores radica en el hipotético riesgo que suponen éstos para las explotaciones de rumiantes domésticos con las que puedan entrar en contacto, especialmente en el caso de granjas que se encuentren libres de la enfermedad (Chiodini y Van Kruiningen, 1983; Daniels *et al.*, 2003b; Corn *et al.*, 2005).

Experimentalmente se ha demostrado la capacidad de infección que cepas aisladas de animales de vida salvaje pueden tener en rumiantes domésticos (Williams *et al.*, 1983; Dukes *et al.*, 1992; Beard *et al.*, 2001b). Esto los convierte en un factor a tener en cuenta a la hora de diseñar planes de control de la enfermedad. A la inversa, poblaciones de animales salvajes susceptibles pueden ser infectados a partir de explotaciones donde la enfermedad esté presente, lo que puede tener graves consecuencias, especialmente en el caso de animales de gran valor biológico o especies protegidas (Riemann *et al.*, 1979).

3.7.Importancia de *Map* en Salud Pública

3.7.1. Posible implicación en la enfermedad de Crohn y otras enfermedades

La importancia de *Map* en salud pública deriva fundamentalmente de la controversia acerca de su posible papel en el desencadenamiento, establecimiento o persistencia de la enfermedad de Crohn. Ésta es una enfermedad crónica inflamatoria del intestino en el hombre, caracterizada por malestar general, pérdida crónica de peso, dolor abdominal y diarreas, acompañado en ocasiones por fiebre (Chiodini, 1989; Stange *et al.*, 2006). Fue descrita por primera vez en 1913 por Dalziel (Dalziel, 1913), aunque recibió su nombre del autor de otra descripción posterior de la enfermedad como una patología que afectaba al intestino delgado (Crohn *et al.*, 1932). Posteriormente se ha reconocido que, si bien las lesiones se localizan fundamentalmente en el íleon distal, cualquier parte del tracto gastrointestinal puede estar afectada (Grant, 2005). Forma parte de las llamadas Enfermedades inflamatorias del intestino (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) junto con la colitis ulcerosa; estas enfermedades resultan difíciles de definir, puesto que son más bien síndromes caracterizados por un fenotipo clinicopatológico similar pero con varias causas (Shanahan, 2002). Por ello, los enfermos de Crohn forman un grupo muy heterogéneo, que puede dividirse en 24 subgrupos atendiendo a tres parámetros: edad en el primer diagnóstico, localización de la enfermedad en el tracto gastrointestinal y comportamiento de la enfermedad (más o menos invasiva, o constrictiva) (Gasche *et al.*, 2000). Dada la gran variedad existente entre distintos casos de la enfermedad se especula con que no todos tengan una misma etiología (Grant, 2005).

Las posibles causas de la enfermedad que se han ido investigando a lo largo de los años incluyen (Grant, 2005):

- Un origen infeccioso, debido a micobacterias (*Map*), *E. coli*, *Listeria*, o virus.
- defectos en la mucosa intestinal que dan lugar a desequilibrios en la absorción de bacterias y alimentos.

- alteraciones de la respuesta inmune (problemas de autoinmunidad, lo que se traduce en una respuesta inadecuada del sistema inmune de la mucosa intestinal a la flora bacteriana normal produciendo alteraciones; o problemas de inmunodeficiencia, lo que implica que no se eliminan de forma normal los microorganismos, y por ello se provoca una respuesta inmune celular compensatoria que da lugar a los trastornos).
- susceptibilidad genética.

En la actualidad hay un consenso en la comunidad científica acerca del origen multifactorial de la enfermedad de Crohn, que implicaría una interacción entre ciertos factores de susceptibilidad genética, uno o varios microorganismos y la respuesta inmune del hospedador desencadenada por una lesión en el tejido (Shanahan, 2002).

La enfermedad de Crohn es una patología propia de países desarrollados, y su incidencia, al igual que la del resto de enfermedades inflamatorias del intestino, está experimentando un crecimiento en los últimos años (Loftus, Jr. y Sandborn, 2002). La edad de presentación más habitual es de los 16 a los 25 años, aunque puede aparecer antes o en edad adulta, y afecta por igual a ambos sexos (Loftus, Jr. y Sandborn, 2002; Grant, 2005; Stange *et al.*, 2006). Aún no se ha descubierto una cura, por lo que los únicos tratamientos descritos son paliativos, requiriendo en un amplio porcentaje de los casos (70-80%) cirugías para eliminar el intestino afectado, que posteriormente suelen recidivar (Chiodini, 1989); el abanico terapéutico disponible para controlar los síntomas es muy amplio, dependiendo el tratamiento del grado de enfermedad, localización de la misma, presencia de otras manifestaciones clínicas, posibles efectos adversos de los medicamentos, etc, por lo que debe valorarse individualmente (Travis *et al.*, 2006). Normalmente se dirige a aliviar los síntomas, basándose en antidiarreicos, antiinflamatorios e inmunosupresores. El desconocimiento de la causa de la enfermedad impide el diseño de tratamientos etiológicos.

En lo referente a la posible relación entre *Map* y esta patología cabe destacar que la primera asociación entre paratuberculosis y enfermedad de Crohn data de 1913, pues ya Dalziel comparaba ambas enfermedades basándose en las similitudes en el cuadro clínico y las lesiones (Dalziel, 1913). Desde entonces se ha especulado mucho sobre el posible origen infeccioso de la enfermedad de Crohn. En un intento de responder a esta incógnita, se han realizado numerosos estudios en pacientes de Crohn y de otras IBDs (fundamentalmente de colitis ulcerativa) en busca de evidencias de un contacto con *Map*.

El cultivo bacteriológico de la bacteria en muestras de pacientes enfermos de Crohn es sin duda la demostración irrefutable de su presencia en un estado viable, pero en ocasiones es

muy difícil de lograr. El primer aislamiento de una micobacteria fue obtenido por Chiodini y colaboradores (Chiodini *et al.*, 1984b). En un principio no pudieron identificarla, ya que estaba en lo que luego se definió como esferoplasto o forma con pared celular deficiente (CWD, *Cell Wall Deficient*) (Chiodini *et al.*, 1986), pero observaron algunas características, como el extremadamente largo periodo de incubación (18 meses) y su dependencia de micobactina para el crecimiento *in vitro*. Posteriormente se demostró que ese esferoplasto podía adoptar con el tiempo una forma bacilar, siendo su forma primaria la probable causa del prolongado tiempo necesario para su primoaislamiento y de su incapacidad para teñirse con las técnicas convencionales (Chiodini *et al.*, 1986). Finalmente se identificaron esos esferoplastos como *Map* gracias a análisis de ADN (McFadden *et al.*, 1987). Desde entonces se ha intentado aislar *Map* a partir de biopsias de pacientes de Crohn y controles con resultados irregulares: en un estudio realizado en 439 casos de enfermos de IBD y 324 controles no se consiguió aislar *Map* en ningún caso (aunque sí detectar su ADN) (Collins *et al.*, 2000), mientras Schwartz y colaboradores (Schwartz *et al.*, 2000), Bull y colaboradores (Bull *et al.*, 2003a), y Sechi y colaboradores (Sechi *et al.*, 2005) sí cultivaron la bacteria empleando muestras de mucosa intestinal de un porcentaje mayor de casos enfermos que de controles sanos; también se pudo cultivar a partir de un paciente de VIH a partir de muestras de sangre, heces y de una biopsia (Richter *et al.*, 2002). Naser y colaboradores dieron un paso más al demostrar la distribución sistémica de *Map* mediante cultivo en leche materna de pacientes de Crohn y en sangre de pacientes de Crohn y enfermos de colitis ulcerativa, pero no de los controles (Naser *et al.*, 2000b; Naser *et al.*, 2004).

Dada la dificultad que entraña el cultivo bacteriológico se han adoptado otras dos estrategias para demostrar la implicación de *Map* en la enfermedad de Crohn: la detección de secuencias específicas de su ADN en muestras clínicas (fundamentalmente IS900, aunque esto puede plantear problemas de especificidad; pág. 70) y el análisis serológico en busca de anticuerpos frente a la bacteria. Las técnicas de detección de ADN pueden a su vez subdividirse en las basadas en la extracción del ADN bacteriano y la realización de PCRs o bien las que emplean una sonda específica para realizar una hibridación *in situ*. Desde la primera detección de IS900 de muestras de pacientes de Crohn (Sanderson *et al.*, 1992) se han realizado numerosos estudios, ofreciendo en muchas ocasiones resultados contradictorios. Los diferentes protocolos aplicados, especialmente a la hora de extraer el ADN, podrían explicar esta heterogeneidad; concretamente el no aplicar un protocolo suficientemente agresivo, incorporando una fase de ruptura mecánica de las células, ha sido esgrimido como causa de falsos negativos (Hermon-Taylor *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2003a). De cualquier forma, tomando como referencia los trabajos publicados a partir del 2000, se pueden encontrar estudios que

describen un porcentaje mayor de muestras positivas procedentes de Crohn respecto a controles sanos o con otras enfermedades (Collins *et al.*, 2000; Sechi *et al.*, 2001; Hulten *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2003a; Naser *et al.*, 2004; Sechi *et al.*, 2005; Autschbach *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2005), mientras que otros reflejan resultados discordantes (Fujita *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2003; Ellingson *et al.*, 2003; Baksh *et al.*, 2004; Tzen *et al.*, 2006). En una aproximación ligeramente diferente, Ryan y colaboradores describieron la mayor tasa de detección de ADN de *E.coli* en granulomas de enfermos de Crohn respecto a los controles, reflejando así la posibilidad de que en estos pacientes haya un incremento no específico de la carga bacteriana (Ryan *et al.*, 2004). Sin embargo Clancy y colaboradores detectaron un incremento en los niveles de TNF- α de las muestras de pacientes de Crohn asociado a la presencia de ADN de *Map* (Clancy *et al.*, 2007).

En cuanto a las evidencias aportadas por las pruebas serológicas, el antígeno empleado para detectar los anticuerpos parece tener una gran influencia en los resultados (Grant, 2005). De cualquier forma, una vez más no hay unanimidad en los resultados obtenidos, pues mientras hay autores que detectan un mayor título de anticuerpos frente a elementos de *Map* en pacientes de Crohn (Naser *et al.*, 1999a; Collins *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2001b; Shafran *et al.*, 2002b; Olsen *et al.*, 2003; Barta *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 2006) otros estudios no encuentran asociación entre ambos hechos, o en relación a un genotipo susceptible (ver más adelante) (Bernstein *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2007). Una posible explicación a la discordancia entre los resultados reseñados reside en la posibilidad de reacciones cruzadas en el ELISA que den lugar a falsos positivos (Polymeros *et al.*, 2006).

Recientemente se realizó una revisión y meta-análisis de los trabajos publicados relativos al aislamiento de ADN de *Map* y a la detección de anticuerpos en pacientes de Crohn (Feller *et al.*, 2007). La primera conclusión de dicho trabajo fue que muchos trabajos adolecían de defectos de forma, especialmente en el tamaño de los grupos (casos/controles) y en la selección del grupo de individuos control. A pesar de ello se concluyó que en ambos casos (detección de ADN y serología) se observaba una asociación estadísticamente significativa entre un resultado positivo y ser paciente de Crohn. Sin embargo esta asociación no puede confirmar por sí misma el papel de *Map* como inductor de la enfermedad (Feller *et al.*, 2007).

Una última aproximación al problema consiste en la valoración de los resultados de los tratamientos de pacientes de Crohn basados en antibióticos a los que *Map* es sensible. Básicamente, el tratamiento frente a la enfermedad de Crohn se basa en la supresión de la respuesta inmune del hospedador (mediante corticoesteroides), antiinflamatorios, cirugía, suplementos nutricionales y antibióticos (Grant, 2005). Según algunos investigadores, la

remisión del cuadro clínico de algunos casos gracias a tratamientos antibióticos (normalmente una combinación de claritromicina, rifabutina y/o clofazimina) vendría dado por su efecto sobre *Map* (Hermon-Taylor, 2002). Una vez más, también en este apartado se han publicado resultados contradictorios, que van desde la remisión del cuadro clínico en ciertos pacientes de Crohn (Borody *et al.*, 2002; Shafran *et al.*, 2002a; Borody *et al.*, 2007) hasta la producción de una mejora momentánea (atribuida a un efecto antibacteriano inespecífico) seguida de un mantenimiento de los síntomas sin beneficio observable (Selby *et al.*, 2007). Resulta difícil valorar el posible efecto de estos antibióticos frente a *Map* dada su condición de patógeno intracelular y su metabolismo extremadamente lento. Recientemente se ha descrito un posible efecto bacteriostático y bactericida *in vitro* de algunos medicamentos aplicados en el tratamiento de Crohn como inmunosupresores (Tiopurinas como la 6-mercaptopurina y la azatioprina) (Greenstein *et al.*, 2007; Collins y Shin, 2007) lo que haría necesario valorar de nuevo los estudios publicados hasta la fecha, pues en muchos de ellos se administraban estos inmunosupresores junto con los antibióticos; de igual forma da una explicación a la mejora experimentada por pacientes tratados solo con inmunomoduladores, incompatible con una enfermedad de etiología bacteriana, lo que constituía un argumento para los detractores de la teoría de *Map* como agente causal de la enfermedad de Crohn.

Desde una óptica diferente, se han identificado varios genes asociados con la presencia de esta enfermedad, entre ellos el gen NOD2/CARD15, implicado en la destrucción bacteriana en las células del epitelio intestinal, lo que constituye un indicio de una posible etiología bacteriana asociada (Hugot *et al.*, 2001; Girardin *et al.*, 2003; Rioux *et al.*, 2007). De hecho se ha descrito el caso clínico de un paciente de Crohn en posesión de los alelos de susceptibilidad de NOD2/CARD15 que sufría una infección por *Map* (Behr *et al.*, 2004). La proporción de casos de Crohn atribuibles a mutaciones en el gen NOD2/CARD15 no rebasa el 15-30%; esto podría resaltar la importancia de otros factores genéticos y ambientales responsables de otros casos. Por otra parte, una proporción muy elevada de personas con los alelos de riesgo no desarrollan la enfermedad. Esto último puede explicarse porque haya otras rutas compensatorias del déficit protector que origina esa mutación, o bien porque la mutación solo sea un factor de riesgo en presencia de algún otro elemento, como podría ser la acción de un microorganismo (Behr y Schurr, 2006).

A pesar de los muchos estudios realizados en distintos campos, la relación entre *Map* y la enfermedad de Crohn sigue siendo objeto de controversia (Hermon-Taylor, 2001; Quirke, 2001; Shanahan, 2002; Hermon-Taylor y Bull, 2002; Selby, 2003; Greenstein, 2003; Grant, 2005; Shanahan y O'Mahony, 2005; Sartor, 2005; Cirone *et al.*, 2007; Raizman, 2007). A la luz de los

últimos estudios revisados anteriormente parece existir un grado de asociación entre la presencia de la bacteria y al menos una proporción relevante de los casos de pacientes de Crohn (Uzoigwe *et al.*, 2007; Abubakar *et al.*, 2007a). Sin embargo a día de hoy la naturaleza de esa asociación sigue sin ser determinada, por lo que no se puede asumir un papel causal de *Map* en el desencadenamiento de la enfermedad, tal y como fue concluido por el panel de expertos de la Comisión Europea en el informe emitido en el año 2000 (http://www.ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out38_en.pdf).

También se ha asociado *Map* a la etiología de otras enfermedades como la sarcoidosis (el Zaatari *et al.*, 1996) y a la diabetes mellitus tipo 1 (Dow, 2006; Sechi *et al.*, 2007a; Sechi *et al.*, 2007b; Sechi *et al.*, 2008).

3.7.2. Posibles fuentes de exposición a *Map* para el hombre

El potencial riesgo que podría implicar la exposición a *Map* en relación a estas enfermedades ha hecho que se haya puesto el foco en las posibles vías de transmisión al ser humano (Collins, 1997). En este sentido, es conocida la capacidad de los animales infectados de paratuberculosis de excretar el microorganismo en la leche (ver patogenia, pág. 26). Por ello el consumo de leche de animales infectados podría ser un factor de riesgo en el caso de que contuviera cantidades suficientes de bacterias viables. Numerosos trabajos han detectado la presencia de *Map* mediante PCR o cultivo en muestras de leche individuales o de tanques procedentes de ovino, caprino y bovino (Giese y Ahrens, 2000; Grant *et al.*, 2001; Pillai y Jayarao, 2002; Grant *et al.*, 2002a; Paolicchii *et al.*, 2003; Bosshard *et al.*, 2006; Arrigoni *et al.*, 2007; Shankar *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que la mayor parte de la leche dedicada al consumo humano se somete previamente a tratamientos térmicos, se han realizado numerosos estudios para determinar la capacidad de *Map* para sobrevivir a dichos tratamientos (a los que habitualmente se somete la leche), diseñados para la inactivación de *M. bovis*. Todos los estudios destacan la mayor capacidad de *Map* para resistir el calor, aunque sus resultados sobre su capacidad para permanecer viable en concentraciones detectables difieren. Tomando como referencia los trabajos publicados en los últimos siete años, mientras algunos concluyen que las actuales condiciones de pasteurización deberían eliminar las cantidades esperables de bacterias (Pearce *et al.*, 2001; Stabel, 2001; Cerf *et al.*, 2007; Rademaker *et al.*, 2007), otros estudios concluyen que parte las micobacterias pueden subsistir en leche naturalmente (Grant *et al.*, 2002b) o artificialmente infectada (Gao *et al.*, 2002; Stabel y Lambertz, 2004; McDonald *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2005). Además de la temperatura, otros factores como la presión (Donaghy *et al.*, 2007) o la homogeneización durante el tratamiento (Grant *et al.*, 2005) pueden afectar a

las tasas de supervivencia de *Map* [si bien no en todos los casos (Rademaker *et al.*, 2007)]. Resulta difícil comparar los resultados de los distintos estudios debido a la existencia de distintas condiciones de laboratorio, lo que hace necesario la unificación de la metodología para poder concluir mediante experiencias de laboratorio si la leche, sometida a los tratamientos térmicos actuales, supone un riesgo potencial o no para el público (Stabel, 2000a; Lund *et al.*, 2002). De cualquier forma, la probabilidad de encontrar *Map* en leche pasteurizada será tanto mayor como sea su concentración en la leche previa al tratamiento, viéndose favorecida su supervivencia por su capacidad de formar agregados (Grant, 2005).

Siguiendo un enfoque distinto de las anteriores investigaciones de laboratorio, algunos grupos han podido evidenciar la presencia de *Map* en leche pasteurizada lista para su comercialización. En este caso es muy importante la diferenciación entre la detección de ADN (O'Reilly *et al.*, 2004; Lillini *et al.*, 2008) y la de bacterias (Millar *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2002a; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005a; Paolicchii *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2007), ya que mientras que la primera puede suponer que la pasteurización ha inactivado los bacilos presentes, la detección de *Map* por cultivo implica un potencial riesgo de infección. No obstante algunos autores atribuyen estos aislamientos a fallos en los procesos de pasteurización o posibles contaminaciones cruzadas en el laboratorio (Mendez *et al.*, 2006; Cerf *et al.*, 2007).

Además de la leche, se ha apuntado a los derivados lácteos como posibles fuentes de *Map*: el alimento más estudiado ha sido el queso. Dos trabajos valoraron la tasa de supervivencia de *Map* en el madurado de quesos preparados con leche contaminada artificialmente con bacterias: Sung y colaboradores determinaron que en la acidificación producida durante el proceso de maduración del queso fresco disminuía sensiblemente su viabilidad, mientras que el incremento en la concentración de sal no tenía efecto (Sung y Collins, 2000); Spahr y colaboradores obtuvieron resultados similares en un estudio realizado en quesos suizos curados y semicurados (Spahr y Schafroth, 2001). En ambos casos se resaltó la importancia del calentamiento previo de la leche antes del procesamiento del queso. Estudios similares realizados en queso Cheddar elaborado con leche contaminada con *Map* revelaron el riesgo de que parte de los bacilos sobrevivieran el proceso de maduración (Donaghy *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2004). El análisis de quesos procedentes de supermercados y tiendas en distintos países revelaron la presencia de *Map* mediante detección de ADN (Clark, Jr. *et al.*, 2006; Stephan *et al.*, 2007) y cultivo (Ikonomopoulos *et al.*, 2005) en un pequeño porcentaje de las muestras, revelando otra potencial vía de exposición para el consumidor.

Otros posibles vehículos de *Map* que han sido investigados son el agua y la carne. Whan y colaboradores demostraron la capacidad del microorganismo de sobrevivir a ciertos

tratamientos de cloración (Whan *et al.*, 2001), y en estudios independientes fue detectado en muestras de ríos cuya agua se destinaba después de tratamientos potabilizadores al consumo humano (Pickup *et al.*, 2005; Whan *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2006). La posible interacción de *Map* con protozoos presentes en el agua, demostrada experimentalmente (Whan *et al.*, 2006; Mura *et al.*, 2006), podría aumentar su resistencia a estos tratamientos, lo que unido a su capacidad para sobrevivir en ella durante largos periodos de tiempo (pág. 39) indica que el agua puede ser otra potencial fuente de exposición.

Por último, se ha especulado con la posibilidad de que la carne también pudiera transportar *Map*, especialmente en el caso de carne picada, elaborada con animales viejos, debido a la diseminación del microorganismo en un lote de producto si se incluyen tejidos (linfonodos) infectados (Grant, 2005). Aunque esta hipótesis es posible no ha podido ser demostrada de forma empírica hasta la fecha, ya que los estudios realizados en este sentido no han detectado la presencia de *Map* (Jaravata *et al.*, 2007).

A pesar de todas estas evidencias, hasta la fecha no se ha podido asociar de forma inequívoca una mayor tasa de exposición a estas posibles fuentes de *Map* y una mayor incidencia de enfermedad de Crohn. Así, mientras Scanu y colaboradores sí observaron una asociación entre la infección por *Map* en pacientes de Crohn en Cerdeña y el consumo de quesos artesanales (Scanu *et al.*, 2007), Abubakar y colaboradores no encontraron esa relación entre el establecimiento de la enfermedad y el mayor contacto con los alimentos potencialmente contaminados (agua y leche) en 218 casos y 812 controles (Abubakar *et al.*, 2007b). Por lo tanto, siguen siendo necesarios nuevos estudios agrupando todas las facetas de la enfermedad (factores genéticos, posibles factores de riesgo tales como exposición a fuentes de *Map*, presencia de *Map* u otros agentes en pacientes y ausencia en enfermos...) para poder determinar el papel patógeno de este microorganismo en la etiología de la enfermedad de Crohn.

4. IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR EL COMPLEJO *M.tuberculosis*

4.1. Tuberculosis humana

La tuberculosis humana, causada principalmente por *M. tuberculosis* y, en menor medida, por *M. bovis* y *M. caprae*, sigue siendo una enfermedad de gran importancia para la Salud Pública. A pesar de que su agente etiológico fue identificado hace más de 100 años, la tuberculosis está muy lejos de ser una enfermedad controlada. En la década de los 80 se llegó a creer que podría dejar de ser un problema de Salud Pública, especialmente en los países desarrollados, gracias a los nuevos tratamientos antibióticos que se diseñaron. Sin embargo esta percepción cambió radicalmente en los años siguientes debido al constante incremento de casos de tuberculosis tanto en Estados Unidos como en Europa. Las causas de esta inversión en la tendencia descendente de la enfermedad fueron la epidemia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el aumento de la pobreza (sobre todo en áreas metropolitanas) y el flujo creciente de inmigrantes procedentes de países en vías de desarrollo, donde la prevalencia de la tuberculosis es mucho mayor (Raviglione, 2003). La nueva situación hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara la tuberculosis en situación de emergencia global. (WHO, 1994). A pesar de los esfuerzos invertidos en el control de la enfermedad, sigue siendo una de las principales infecciones causantes de muertes en adultos (1,6 millones de personas en 2005). Según datos de la OMS cada segundo se produce una nueva infección por el bacilo de la tuberculosis en el mundo y aproximadamente una tercera parte de la población mundial está actualmente infectada por *M. tuberculosis* (Dye *et al.*, 1999). De éstos últimos, alrededor de una décima parte desarrollará la enfermedad y excretará el bacilo, constituyendo por tanto un nuevo foco de infección. De especial importancia resultan los casos de coinfección por VIH y tuberculosis, ya que ambos patógenos actúan de forma sinérgica incrementando la patogenicidad del otro. Así, la tuberculosis es la causa más común de mortalidad en adultos infectados por el VIH en países en vías de desarrollo (Odhiambo *et al.*, 1999; Thoen *et al.*, 2006). En el año 2000 la población coinfectada por VIH y tuberculosis ascendía a 11 millones de personas en todo el mundo, lo que constituye un obstáculo formidable para lograr el control y la eventual erradicación de la enfermedad.

Aunque la tuberculosis causada por *M. bovis* es comparativamente poco frecuente, especialmente en países desarrollados (Grange, 2001), la tuberculosis bovina se considera una enfermedad zoonótica de gran relevancia, y por ello se dedican grandes esfuerzos y recursos a su control. La proporción de casos de tuberculosis humana debidos a *M. bovis* es, de cualquier

forma, muy difícil de estimar con precisión, pues en muchas ocasiones tan solo se identifica al agente causal como perteneciente al complejo *M. tuberculosis* (Reviriego Gordejo y Vermeersch, 2006; Thoen *et al.*, 2006). En 2005 se notificaron 119 casos de tuberculosis humana causada por *M. bovis* en la Unión Europea (4 de ellos en España), lo que constituye el mayor registro de casos desde 2001. La mayoría de ellos fueron notificados en individuos mayores de 65 años (EFSA, 2006). La principal fuente de *M. bovis* para la población humana es el ganado vacuno, especialmente a través de productos elaborados a partir de leche sin pasteurizar procedente de animales infectados (2005; de la Rua-Domenech, 2006). También se han descrito infecciones a partir de ciervos (Fanning y Edwards, 1991), focas (Thompson *et al.*, 1993) y rinocerontes (Dalovisio *et al.*, 1992). Tradicionalmente se ha considerado la transmisión entre personas como un fenómeno muy poco frecuente; sin embargo hay evidencias de que en determinadas circunstancias *M. bovis* puede causar brotes transmisibles entre personas infectadas (Evans *et al.*, 2007).

Otro de los posibles agentes causales de tuberculosis en el hombre es *Mycobacterium caprae*, causante de tuberculosis en cabras principalmente, pero también en ganado vacuno y otras especies (Gutiérrez *et al.*, 1997; Aranaz *et al.*, 1999; Prodingier *et al.*, 2002; Kubica *et al.*, 2003; Aranaz *et al.*, 2003).

4.2. Tuberculosis en animales de abasto

Varios países de la Comunidad Europea están calificados como libres de tuberculosis bovina (*officially tuberculosis-free*, OTF). Sin embargo en varios países miembros aún se llevan a cabo planes de erradicación de esta enfermedad para alcanzar ese estatus, entre ellos España. La erradicación se define como la consecución de no más de un 0,1% de rebaños bovinos infectados por año durante 6 años consecutivos, y que al menos el 99,99% de los rebaños sean oficialmente libres durante esos 6 años consecutivos. La relevancia de la tuberculosis bovina radica no solo en su influencia sobre la productividad ganadera y en su condición de enfermedad zoonótica, sino también a las restricciones asociadas dentro del mercado intracomunitario de animales, sus carnes y sus productos.

Los primeros programas de control de la tuberculosis bovina se empezaron a aplicar a nivel nacional en España en 1986, aunque dirigiéndose principalmente al ganado lechero. Desde esa fecha hasta la actualidad la prevalencia de la enfermedad ha ido disminuyendo de forma sostenida, si bien en los últimos años el descenso ha sido menos pronunciado (Gráfico 1).

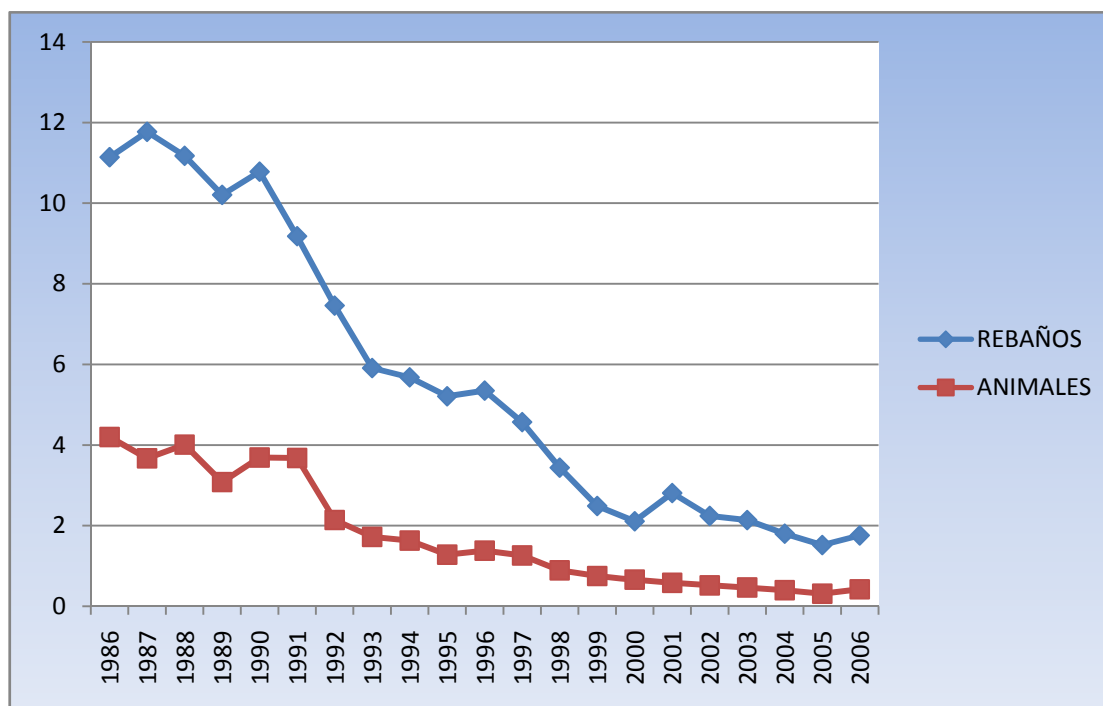


Gráfico 1. Evolución en porcentaje de la prevalencia en rebaño y la incidencia en animales de la tuberculosis bovina en el periodo 1986-2006 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007).

La prevalencia de rebaño registrada en el 2006 fue de un 1,76%, (un 0,44% en animales) si bien hay una gran variabilidad entre Comunidades Autónomas (CCAA): desde un 5,76% en Andalucía hasta un 0,17% en Asturias (Tabla 1). De forma general se puede decir que hay mayores prevalencias en la parte sur y centro oeste del país, mientras que la cornisa cantábrica y el levante presentan menor presencia de la enfermedad. Esta variabilidad puede explicarse por diferencias climáticas (la prevalencia es mayor en zonas más secas y calurosas, ya que esto favorece la agregación de animales y con ello la diseminación de la enfermedad) y productivas: en el norte y este de España se concentra el ganado de aptitud lechera, en el que las prevalencias de la enfermedad son menores; por el contrario, en el sur y en la meseta hay un mayor porcentaje de ganado de carne, que empezó a ser saneado más tarde que el de leche, y por ello presenta unas prevalencias de tuberculosis algo superiores. Además, una alta proporción de las explotaciones de carne se explotan en régimen extensivo, en ocasiones en zonas de difícil acceso, con razas autóctonas de manejo complicado, y que pueden estar compartiendo pastos con otras especies (como la caprina) que pueden actuar como reservorios de la enfermedad.

CCAA	2001	2002	2003	2004	2005	2006
ANDALUCÍA	12,32	9,65	8,47	6,73	5,32	5,76
ARAGÓN	3,74	3,14	2,75	2,03	1,56	1,96
ASTURIAS	0,3	0,32	0,22	0,24	0,18	0,17
BALEARES	0,82	0,92	1,02	0,65	0,65	0,22
CANARIAS	0,53	0,34	1,05	2,4	1	0,36
CANTABRIA	0,73	1	1,34	1,41	1,16	1,05
CAST. LA MANCHA	8,8	7,69	3,36	7,19	7,02	7,71
CASTILLA Y LEÓN	5,21	5,1	5,66	3,78	3,37	5,11
CATALUÑA	3,09	1,93	1,74	1,78	1,7	1,65
EXTREMADURA	8,69	7,45	5,95	5,57	4,05	4,84
GALICIA	0,56	0,52	0,43	0,46	0,31	0,20
LA RIOJA	2,7	2,05	2,7	2,76	1,31	0,72
MADRID	8,04	3,69	3,92	1,99	2,58	2,59
MURCIA	9,02	5,79	1,48	7,59	4,46	4,96
NAVARRA	0,6	0,52	0,82	0,36	0,38	0,27
PAÍS VASCO	0,16	0,06	0,17	0,22	0,64	0,19
VALENCIA	25,22	12,47	5,56	2,63	2,16	1,61
TOTAL	2,9	2,7	2,14	1,8	1,52	1,76

Tabla 1. Prevalencias de rebaño de tuberculosis bovina por CCAA en el periodo 2001-2006 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007).

Un último factor a destacar es la existencia de otras especies de vida salvaje que también pueden actuar como reservorios (principalmente el jabalí y el ciervo) (Parra *et al.*, 2003; Aranaz *et al.*, 2004; Gortázar *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2006; Hermoso de Mendoza J. *et al.*, 2006; Martín-Hernando *et al.*, 2007; Naranjo *et al.*, 2008), y que se encuentran en densidades muy superiores en la mitad sur del país (Vicente *et al.*, 2007). Todo esto puede explicar la mayor lentitud en el avance del programa de erradicación nacional en estas regiones.

Para alcanzar el objetivo de la erradicación de la tuberculosis bovina es fundamental detectar los animales infectados tan rápido como sea posible. Por ello es determinante la sensibilidad de las pruebas diagnósticas empleadas. En la actualidad las pruebas rutinarias de diagnóstico oficial de la tuberculosis son la Intradermotuberculinización (IDTB) simple y la IDTB comparada (Real Decreto 2611/1996, anexo 1). La primera consiste en la inoculación de un derivado purificado proteico (tuberculina o PPD) preparado a partir de la cepa de *M. bovis* AN5. El fundamento de la prueba se basa en que, si esa tuberculina se inyecta a un animal cuyo

sistema inmune ya ha estado en contacto con *M. bovis*, provoca una reacción inflamatoria en el punto de inoculación que alcanza la máxima intensidad a las 48-72 horas post-inyección y que desaparece poco después. Por el contrario, si se somete a este test a un animal no infectado, no se observa reacción aparente.

La IDTB simple ha sido la piedra angular de muchos programas de erradicación, y en muchos casos ha permitido lograr la erradicación de la enfermedad (Monaghan *et al.*, 1994). Pero también se han identificado, con el paso del tiempo, una serie de factores que disminuyen la capacidad del test para identificar animales infectados (sensibilidad) y su habilidad para diferenciar los no infectados (especificidad).

Entre los factores que condicionan esta última se encuentra el hecho de que algunas de las proteínas existentes en la PPD bovina se encuentran también presentes en otras micobacterias, algunas de las cuales son ambientales (Aagaard *et al.*, 2003). Por tanto animales que hayan sido expuestos a estas otras micobacterias pueden dar una respuesta positiva en la prueba diagnóstica. Por ello se puede emplear la prueba de la IDTB comparada o de comparación (RD 2611/1996, anexo 1, modificado por el RD 1047/2003). En ella se inyecta simultáneamente en dos localizaciones separadas la PPD bovina y otra PPD preparada a partir de ciertas cepas de *Mycobacterium avium*, como la D4ER o la cepa 10 (Semret *et al.*, 2006a) (tuberculina aviar). Posteriormente se miden y comparan las respuestas inflamatorias a ambas tuberculinas; aquellos animales que no estuvieran infectados por *M. bovis* pero estuvieran respondiendo a la PPD bovina deberían mostrar una respuesta igual o mayor a la PPD aviar, lo que permite clasificarlos como negativos (Paterson *et al.*, 1958). Esta prueba diagnóstica es por lo tanto más específica, y su uso está indicado en aquellas áreas en las que hay una baja prevalencia de tuberculosis bovina y se espera un elevado índice de animales reactores no infectado por *M. bovis* (reactores aviarios o inespecíficos). En España su uso está contemplado en rebaños oficialmente indemnes pertenecientes a CCAA de prevalencia de rebaño inferior al 1% o a ciertas unidades veterinarias con prevalencias inferiores al 1% situadas en CCAA con prevalencias superiores.

Otra alternativa diagnóstica es el test de detección de Interferón-gamma (IFN- γ). Dicho test mide la producción de IFN- γ producida por los linfocitos estimulados con PPD bovina *in vitro*, comparándola normalmente con la producción al realizar la estimulación con PPD aviar (Wood *et al.*, 1990; Rothel *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1991; Rothel *et al.*, 1992). Esta prueba ha demostrado una gran sensibilidad y es capaz de detectar animales infectados en fases iniciales de la enfermedad (Gormley *et al.*, 2006), pero tiene una menor especificidad (Lauzi *et al.*, 2000; Vordermeier *et al.*, 2001). En la actualidad en la legislación europea y nacional se contempla el

empleo de este test como prueba diagnóstica complementaria en paralelo con la IDTB para la detección del máximo número de animales infectados [Directiva Europea 64/432/EEC, modificada por EC 1226/2002 del 8 de Julio 2002, (Anon., 2002)].

En la actual situación, con bajas prevalencias de enfermedad y por tanto próximos a la fase de erradicación, pero sin haber llegado todavía a ella, es fundamental potenciar la sensibilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas en los planes de saneamiento, aun a riesgo de aumentar los falsos positivos (y por tanto disminuir la especificidad) en cierta medida. Dentro de los factores que pueden comprometer la sensibilidad de las pruebas cutáneas hay varias posibles causas (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006):

1. Elementos relacionados con las tuberculinas empleadas: que no tengan la potencia suficiente, o que no hayan sido conservadas adecuadamente.
2. Factores relacionados con la realización de la técnica diagnóstica: inyectar la cantidad correcta de PPD en el lugar apropiado, realizar la lectura de la prueba en el plazo de tiempo indicado, posibles fraudes intencionados... (Monaghan *et al.*, 1994).
3. Factores relacionados con el propio estado inmune del animal analizado: se han descrito como causas de falsas respuestas negativas en animales infectados la desensibilización a la tuberculina (por haber repetido un test demasiado pronto) (Monaghan *et al.*, 1994; Doherty *et al.*, 1995b; Thom *et al.*, 2006), periodos pre-alérgicos (el animal ha sido infectado muy recientemente y no ha instaurado aún una respuesta inmune detectable), anérgicos (por infección generalizada el sistema inmune no es capaz de responder a nuevos estímulos) (Pollock y Neill, 2002) o post-parto (por la inmunodepresión producida) (Kehrli, Jr. *et al.*, 1989), administración de productos inmunosupresores (*i.e.* corticoesteroides) (Doherty *et al.*, 1995a) o vacunas (frente a *Map*) (Ewer *et al.*, 2006) y sensibilizaciones con micobacterias ambientales (fundamentalmente *M. avium*) (Amadori *et al.*, 2002; Hope *et al.*, 2005).

Mientras que, mediante controles exhaustivos y buenas prácticas de manejo, se puede evitar o minimizar el impacto de los dos primeros casos, las variaciones en la respuesta inmune del animal analizado son un factor de variabilidad diagnóstica con el que se debe contar. De todas las posibles causas de falsos negativos enumeradas, el posible efecto de la sensibilización con micobacterias no tuberculosas merece una especial atención: en varias regiones de Europa donde la tuberculosis aún no ha sido erradicada (Reino Unido, Irlanda, área mediterránea) la paratuberculosis está extendida en el ganado vacuno, aunque no hay datos precisos de prevalencia. En un estudio experimental, Amadori y colaboradores demostraron que animales

con reacciones positivas a la tuberculina aviar infectados experimentalmente con *M. bovis* podían dar falsas respuestas negativas a la IDTB comparada y al test de detección de IFN- γ (Amadori *et al.*, 2002). Del mismo modo, Hope y colaboradores realizaron un estudio similar en animales infectados experimentalmente con *M. avium* y *M. bovis*, encontrando los mismos resultados (Hope *et al.*, 2005). Por desgracia en ambos casos el pequeño número de animales investigados (seis en el primer estudio y 20 en el segundo), el empleo de una bacteria ambiental como *M. avium* (que generalmente solo produce infecciones transitorias en el ganado vacuno) (Weiss *et al.*, 2002) y el hecho de tratarse de infecciones experimentales hace arriesgado el trasladar estos resultados a lo que puede darse en situaciones de campo, con animales expuestos de forma natural a *M. bovis* y *Map*.

5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO *avium*

La diferenciación y caracterización de los aislados de micobacterias fue hecha durante un primer periodo (desde los inicios de la microbiología hasta finales de la década de los 80) mediante técnicas fenotípicas. Estas herramientas, aunque útiles para diferenciar la mayoría de las especies, son en general lentas y, a veces, poco reproducibles, y muchas veces no son eficaces para caracterizar con precisión un brote. En algunos casos, además, aislados de una misma especie pueden presentar una elevada variabilidad fenotípica (Koivula *et al.*, 2004), lo que dificulta la interpretación de los resultados.

Sin embargo, a partir de la década de los 90, gracias a los avances en el campo de la biología molecular, empezaron a aplicarse técnicas de identificación y tipificación basadas en el estudio del ADN de las bacterias. Muchas de las conclusiones obtenidas mediante técnicas de caracterización fenotípica se vieron confirmadas por los estudios genotípicos realizados a continuación, pero gracias al mayor poder de definición de este nuevo enfoque se separaron algunas especies y se definieron otras nuevas (Tortoli, 2003). Las técnicas que pueden aplicarse son variadas, y van desde la detección de mutaciones puntuales (*Single nucleotide polymorphism*, SNP) hasta la identificación de grandes polimorfismos (*Large sequence polymorphisms*, LSP). En la actualidad, y gracias a la aplicación de técnicas genéticas, el número de especies de micobacterias sigue aumentando cada año, y sobrepasa ya las 120 especies (31 de ellas descritas entre el 2003 y el 2006) (Tortoli, 2006). Paralelamente, y en lo que hace referencia al complejo *avium*, se ha profundizado enormemente en el conocimiento de su diversidad genética, de su posible filogenia y se han definido nuevas especies (Mijs *et al.*, 2002; Tortoli *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2006). A continuación se describen las principales dianas utilizadas en el estudio del género *Mycobacterium* y, por extensión, de MAC.

5.1. Secuenciación del gen ARNr 16S

Este gen codifica el ARNr 16S, y tiene una longitud de aproximadamente 1500 nucleótidos. Es una diana muy utilizada para estudios taxonómicos, ya que es un gen muy conservado en el que se localizan regiones comunes a todos los seres vivos y otras con una mayor concentración de SNPs entre especies (Rogall *et al.*, 1990; Tortoli, 2003). Estas últimas, llamadas “hipervariables”, permiten la diferenciación de la mayoría de especies de micobacterias, aunque con algunas excepciones (por ejemplo, todas las especies del complejo *M. tuberculosis* presentan la misma secuencia de ARNr 16S). El estudio de diferencias en la estructura secundaria del gen resulta además de gran utilidad para el análisis filogenético (Stahl y Urbance, 1990). Por lo tanto, conociendo la secuencia de este gen pueden diseñarse

oligonucleótidos complementarios a zonas del gen conservadas en todo el género *Mycobacterium* que amplifiquen un fragmento específico del género (Boddinghaus *et al.*, 1990). El mayor inconveniente que ofrece este método de identificación es que la fiabilidad del resultado depende enteramente de la calidad de las bases de datos disponibles para comparar la secuencia de la cepa problema con otras secuencias publicadas (Turenne *et al.*, 2001; Harmsen *et al.*, 2003). En la actualidad se pueden consultar las bases de datos de RIDOM (*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*, <http://www.ridom.de>) y del Genbank, producida por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>). Otro inconveniente de la técnica es la existencia de aislados con dos copias diferentes de este gen (Ninet *et al.*, 1996; Reischl *et al.*, 1998), si bien esto es poco frecuente en micobacterias de crecimiento lento, o de especies distintas que presentan una secuencia idéntica (como *M. kansasii* y *M. gastri* o las pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*) (Rogall *et al.*, 1990). Así, la secuenciación del gen ARNr 16S tiene una gran aplicación a la hora de identificar y relacionar géneros o especies bien definidas, pero su aplicación en el estudio de especies de reciente aparición puede ser más limitada (Fox *et al.*, 1992).

Mediante la secuenciación de este gen podemos diferenciar las dos especies tradicionales de MAC, *M. avium* y *M. intracellulare*, y las dos especies de reciente descripción, *M. chimaera* (con un solo SNP de diferencia con *M. intracellulare*) (Tortoli *et al.*, 2004) y *M. colombiense* (con mayor similitud con *M. avium*) (Murcia *et al.*, 2006). Sin embargo, todas las subespecies de *M. avium* presentan una secuencia idéntica del gen ARNr 16S, por lo que resultan indistinguibles (Harmsen *et al.*, 2003).

El gen ARNr 16S es la diana de algunos sistemas comerciales de diagnóstico; concretamente, el Accuprobe test (GenProbe, Inc. San Diego, CA, EEUU) fue uno de los primeros en desarrollarse; las primeras sondas diseñadas estaban marcadas con radioisótopos de yodo, con los consiguientes inconvenientes de trabajar con material radiactivo (Drake *et al.*, 1987); por ello se desarrollaron después sondas marcadas químicamente, más prácticas y fáciles de usar (Goto *et al.*, 1991; Lebrun *et al.*, 1992), capaces de distinguir entre los aislados más frecuentes y relevantes en muestras humanas (complejo *M. tuberculosis*, MAC, *M. kansasii* y *M. goodii*). Dentro de MAC, también se han comercializado sistemas que distinguen entre *M. avium* y *M. intracellulare*. Sin embargo estas sondas pueden dar resultados discordantes de difícil interpretación, y aislados no pertenecientes a MAC pueden dar reacciones cruzadas (Soini *et al.*, 1996; Devallois *et al.*, 1997b).

5.2. Secuenciación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Los genes que codifican el ARNr (16S, 23S y 5S) están separados por regiones de ADN no codificantes. El fragmento que separa los genes 16S y 23S es considerado una buena diana para estudios taxonómicos, ya que está flanqueado por regiones muy conservadas (lo que facilita el diseño de oligonucleótidos universales) y resulta más variable que el gen ARNr 16S, por lo que tiene mayor poder discriminatorio (Frothingham y Wilson, 1993; Roth *et al.*, 1998). Precisamente por su variabilidad no resulta fiable para el estudio filogenético de especies que no hubieran sido descritas previamente, pero es útil para la caracterización de cepas dentro de cada especie, y ha sido empleado para caracterizar cepas virulentas de MAC (De Smet *et al.*, 1995). También se ha desarrollado un kit comercial de identificación molecular basado en esta secuencia, el Inno-LiPA (Innogenetics, Gante, Bélgica), capaz de diferenciar entre varias especies de micobacterias, entre ellas *M. avium* y *M. intracellulare* (Miller *et al.*, 2000; Suffys *et al.*, 2001).

En lo referente a MAC la secuenciación del ITS permite la diferenciación de 7 secuencias distintas o “sequevares” dentro de *M. avium* (llamados Mav-A a Mav-H), 4 “sequevares” de *M. intracellulare* (Min-A a Min-D) y más de 30 “sequevares” pertenecientes a especies encuadradas en MAC pero distintas de las dos anteriores, denominados MAC-A a MAC-X; la especie *M. chimaera* presenta el sequevar MAC-A, y *M. colombiense* el MAC-X (De Smet *et al.*, 1995; Mijs *et al.*, 2002; Tortoli *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2006; Turenne *et al.*, 2007). Por desgracia este método no puede aplicarse para identificar la subespecie a la que pertenece un aislado, ya que *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *Map* presentan el mismo sequevar, Mav-A (Turenne *et al.*, 2006).

5.3. Secuenciación del gen *hsp65*

El gen que codifica la proteína resistente al calor de 65 kDaltons (*65-kDa heat shock protein gene*), de 1626 nucleótidos, ha sido empleado para la identificación de micobacterias desde hace más de 15 años. En 1993 Telenti y colaboradores describieron una técnica de PCR y restricción enzimática (PCR- *Restriction Enzyme Analysis*, REA) a partir de los primeros 441 nucleótidos del gen, llamados por ello “fragmento de Telenti”. Este fragmento se amplificaba y se sometía después a una digestión enzimática mediante las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*. Los patrones de digestión resultantes sirvieron para diferenciar un gran número de aislados hasta el nivel de especie/subespecie (Telenti *et al.*, 1993b).

Esta técnica es barata, sencilla y rápida, por lo que ha sido utilizada para la identificación de aislados de micobacterias de crecimiento rápido y lento, incluyendo a veces otras enzimas para incrementar el poder de discriminación (Steingrube *et al.*, 1995; Devallois *et al.*, 1997a). Sin embargo este método también presenta ciertos inconvenientes: los patrones de bandas de algunas especies son iguales o casi iguales, y el pequeño tamaño de algunas bandas resultantes, situadas en el límite de lo visible en geles de agarosa, hacen que la interpretación de los resultados resulte a veces difícil de estandarizar para estudios interlaboratoriales (Ringuet *et al.*, 1999).

Una alternativa a la digestión enzimática es la secuenciación del fragmento de Telenti, opción que se ha empleado en los últimos años (Swanson *et al.*, 1997; Ringuet *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005) gracias a la creciente disponibilidad de secuenciadores en centros de investigación. La secuenciación proporciona una información más fiable, aunque resulta más cara. Al aplicar esta técnica a 56 aislados de MAC, Swanson y colaboradores (Swanson *et al.*, 1997) describieron un total de 11 alelos (*hsp65.1* a *hsp65.7*, *hsp65.9* y *hsp65.11* a *hsp65.13*) que permitían diferenciar las especies *M. avium* y *M. intracellulare*, encontrando un mayor grado de diversidad en la última (solo los alelos *hsp65.1* y *hsp65.2* pertenecieron a aislados de *M. avium*).

Con el fin de incrementar el poder discriminatorio de la secuenciación de este gen en *M. avium*, y teniendo en cuenta que el extremo 5' (al que pertenece el fragmento de Telenti) es el más conservado del gen, Turenne y colaboradores secuenciaron el extremo 3' de un panel de 73 cepas pertenecientes a MAC (Turenne *et al.*, 2006). En total encontraron 14 *sequevars*, 9 en cepas de *M. avium*, 4 en *M. intracellulare* y 1 en *M. chimaera* (relacionados con los alelos descritos en el fragmento de Telenti en la Figura 4). Aunque el número de aislados de *M. intracellulare* incluido en el estudio fue menor que el de *M. avium*, el estudio demostró la menor variabilidad de esta parte del gen respecto a las primeras 441 pares de bases en *M. intracellulare* (en contraposición a lo que sucede en *M. avium*, donde la variabilidad es mayor en el extremo 3'). Todos los aislados de *M. avium* subsp. *avium* tuvieron un *sequevar* (o "código") 4, las cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* el 5 (tipo II) o el 6 (tipo I), y el resto (1-3 y 7-9) aparecieron en aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis*, la especie con una mayor heterogeneidad.

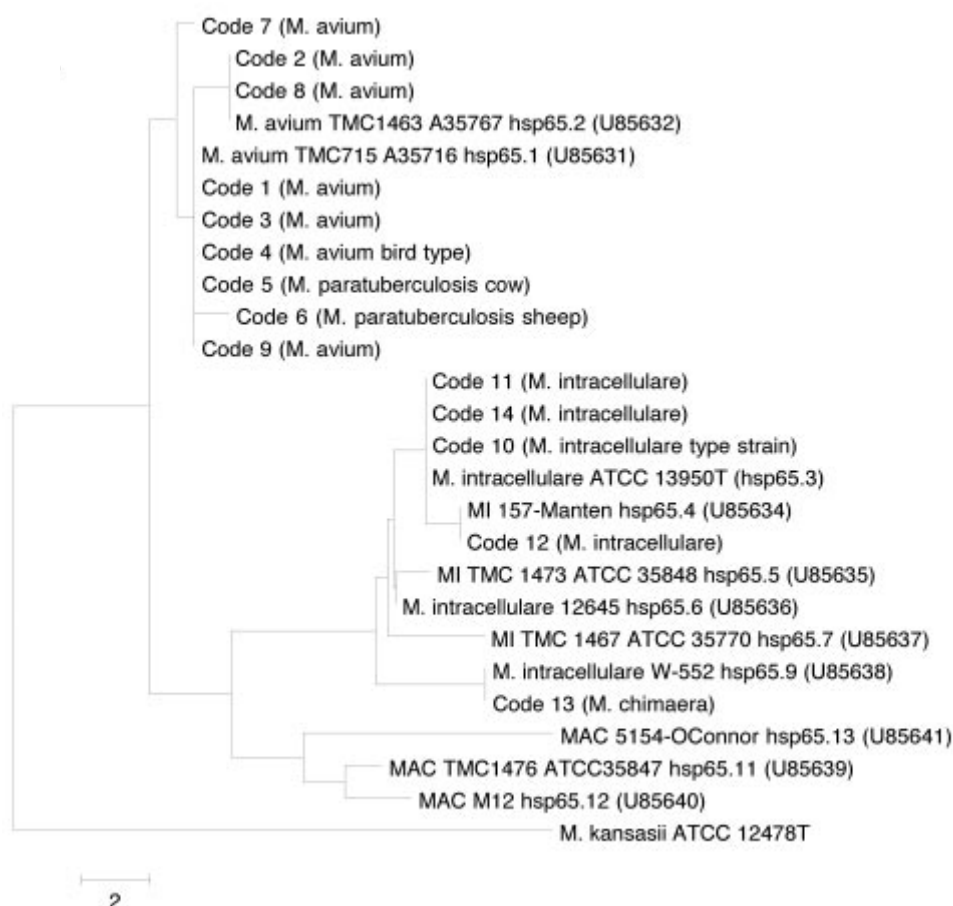


Figura 4. Análisis filogenético de los *sequevares* descritos en el fragmento de Telenti del gen *hsp65* y relación con los *sequevares* descritos en su extremo 3' (Turenne *et al.*, 2006).

5.4. Otros genes utilizados en estudios de identificación molecular: *SodA*, *dnaJ*, *gyrB*, *secA*, *recA*, 32K-Da y *rpoB*

A lo largo de la última década se han realizado estudios de identificación de especies pertenecientes al género *Mycobacterium* mediante el estudio de otros genes “domésticos” o estructurales (*housekeeping*). Entre ellos podemos destacar los siguientes:

- Gen de la proteína de 32-kDa: ésta es una proteína de secreción detectada en varias cepas de distintas especies de micobacterias (De Bruyn J. *et al.*, 1989), cuya secuencia codificante fue determinada en 1989 (Borremans *et al.*, 1989). La presencia de esta secuencia en el género *Mycobacterium* fue posteriormente demostrada en 143 aislados de 28 especies, así como su ausencia en otras bacterias (Soini *et al.*, 1992). En sucesivos estudios en cepas pertenecientes a MAC se comprobó que las cepas de *M. avium*, *M. intracellulare* y MAIX contenían secuencias diferentes, pudiendo por tanto utilizarse este gen para la identificación de aislados con fines diagnósticos (Soini *et al.*, 1994; Soini *et al.*, 1996).

- Gen *dnal*: este gen codifica una proteína de estrés, y está muy conservado en los distintos géneros bacterianos, incluyendo las micobacterias. Takewaki y colaboradores diseñaron un sistema de oligonucleótidos capaces de amplificar un fragmento específico del género *Mycobacterium*, y fragmentos específicos de las especies más relevantes en Salud Pública: complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii* (Takewaki *et al.*, 1993). Un estudio más detallado de la variabilidad de este gen en aislados pertenecientes a MAC reveló que había un 8% de diversidad genética entre todas las cepas estudiadas, concentrándose el mayor grado de variabilidad en los aislados de *M. intracellulare*, en coincidencia con los resultados al analizar otros fragmentos de ADN (Morita *et al.*, 2004).
- Gen *gyrB*: este gen codifica la subunidad B de la enzima ADN-girasa, está implicado en la resistencia a antibióticos, y ha sido utilizado con éxito para estudiar la diversidad genética en otros generos bacterianos, ya que tiene una tasa de sustitución de bases considerablemente mayor que la del gen ARNr 16S (Yamamoto y Harayama, 1996). Su secuencia fue determinada en especies de micobacterias de crecimiento lento, incluyendo *M. avium* y *M. intracellulare*, y el grado de similitud interespecífica fue obtenido y comparado con el resultante de la comparación de las secuencias de la región ITS; en general se obtuvo una mayor divergencia genética en la secuencia de *gyrB*, también en el caso de las cepas de MAC incluidas en el estudio (Kasai *et al.*, 2000).

Posteriores estudios realizados en cepas de *Map* pertenecientes a los tipos I, II y III han revelado que las secuencias de *gyrB* (y de *gyrA*) contenían SNPs capaces de diferenciar los tres tipos sin tener que recurrir a métodos más complejos como el PFGE o el RFLP (Marsh y Whittington, 2007; Castellanos *et al.*, 2007).

- Gen *recA*: este gen está presente en todas las bacterias y cumple una función fundamental en la recombinación y reparación del ADN (Miller y Kokjohn, 1990). Al secuenciar este gen en 2 cepas por especie de un total de 30 especies de micobacterias, Blackwood y colaboradores encontraron una menor homogeneidad que en el gen del ARNr 16S (75.7-96.2% frente a 94.3-100%), demostrando por tanto su posible aplicación en estudios taxonómicos de micobacterias (Blackwood *et al.*, 2000). De las especies incluidas en MAC, *M. avium* presentó una variabilidad intraespecífica de 0.7% (*M. intracellulare* no tuvo variabilidad intraespecífica); la similitud entre estas dos especies a nivel de este gen fue del 95.9%.
- Gen *rpoB*: este gen, implicado en el desarrollo de resistencia a rifampicina, codifica la subunidad β de la ARN-polimerasa, por lo que de su secuenciación puede inferirse información taxonómica y terapéutica (Telenti *et al.*, 1993a). Su secuenciación en un estudio

con varias cepas pertenecientes a 10 especies de micobacterias (Gingeras *et al.*, 1998) y en otro con 44 cepas de referencia y 104 aislados clínicos (Kim *et al.*, 1999) revelaron la existencia de varios alelos en *M. avium* y *M. intracellulare*. La divergencia genética interespecífica entre ambas especies fue además considerable (7.6%), apareciendo en ramas distintas del árbol filogenético trazado con la secuencia de este gen (Kim *et al.*, 1999).

- Gen *secA1*: este gen codifica una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas, y su secuencia fue analizada en 47 cepas de referencia y en 50 aislados clínicos para valorar su aplicación en la identificación bacteriana de micobacterias (Zelazny *et al.*, 2005): la divergencia interespecífica entre las dos especies tradicionales de MAC fue de 95.1% con esta técnica, siendo la similitud intraespecífica de 98.4-99.1% para *M. avium* y de 99.4-100% para *M. intracellulare*.
- Gen *SodA*: la proteína superoxidodismutasa (SOD) codificada por este gen es una enzima antioxidante de gran importancia. La secuencia de este gen en especies de micobacterias fue utilizada por primera vez en 1994 para el diseño de oligonucleótidos específicos de género y de especie (Zolg y Philippi-Schulz, 1994). La homología entre *M. avium* y *M. intracellulare* descrita en este estudio fue del 93.4%, siendo la más alta de entre todas las especies incluidas. En 1995 Bull y colaboradores realizaron un estudio de la variabilidad de esta secuencia en 104 aislados, incluyendo un número mayor de cultivos de MAC (62) (Bull *et al.*, 1995): encontraron un mayor nivel de variabilidad intraespecífica, describiendo 5 sequevares diferentes en aislados de *M. avium* y otros tantos en *M. intracellulare*.

Si bien los trabajos descritos anteriormente pueden ser de gran utilidad a la hora de identificar aislados de micobacterias no tuberculosas, su aplicación a la identificación y caracterización de cepas de MAC es mucho más limitada; esto es así porque en la mayoría de ellos solo se incluyó un número reducido de aislados pertenecientes al complejo *M. avium*, siendo además estos frecuentemente cepas de referencia de *M. avium* y *M. intracellulare*, lo que hace difícil predecir su utilidad a la hora de identificar aislados clínicos. Por otra parte en demasiados casos los fragmentos de ADN de cada gen secuenciados pueden ser demasiado pequeños para detectar una variabilidad suficiente en aislados pertenecientes a especies muy relacionadas, como pueden ser las subespecies de *M. avium*; por último, haría falta incluir una proporción adecuada de aislados de cada uno de los grupos incluidos en MAC, incluyendo más cepas de *Map* y del *cluster X*, así como de las especies recientemente definidas *M. chimaera* y *M. colombiense*. Por todo ello la eficacia real del estudio de estos genes en aislados de MAC aún está por determinar (Turenne *et al.*, 2007).

5.5. Técnicas basadas en la detección de secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (*Insertion sequence*, IS) son transposones, fragmentos de ADN que codifican funciones que les permiten moverse de un sitio de una molécula de ADN a otro. Su longitud puede oscilar entre 780 nucleótidos y 2,5 kbases. En la actualidad en el género *Mycobacterium* se han descrito más de 46 posibles IS, aisladas de 10 especies bacterianas (McAdam *et al.*, 2000), número que sigue incrementándose gracias a la información obtenida por los proyectos de secuenciación de genomas de micobacterias que se van completando. En MAC se ha descrito la presencia de 4 secuencias de inserción que han sido utilizadas para estudios de caracterización molecular. El empleo de estos elementos ha sido de gran utilidad, ya que dependiendo de su número de copias en un genoma y de su movilidad pueden usarse para determinar el grado de relación entre aislados y, por tanto, el vínculo epidemiológico. Sin embargo, en ocasiones pueden conducir a errores, pues algunos han sido tenidos por específicos de especie cuando no lo eran, pudiendo dar lugar por tanto a fallos diagnósticos. Asimismo y, teniendo en cuenta que son elementos móviles por naturaleza, la fiabilidad de los datos que se puedan extraer de su presencia/ausencia y número en una bacteria debe ser analizada cuidadosamente (Behr y Mostowy, 2007).

Las técnicas basadas en la detección de IS son básicamente dos: la determinación directa de la presencia/ausencia de las mismas mediante PCRs dirigidas a fragmentos específicos contenidos en la propia IS (en ocasiones para someterlas a posteriores digestiones enzimáticas) y el empleo de técnicas de análisis de polimorfismos genéticos mediante restricciones enzimáticas (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Esta técnica está basada en la digestión de todo el ADN bacteriano seguido de la separación de los fragmentos resultantes mediante electroforesis. Debido al gran número de bandas que se pueden producir, la interpretación de los resultados es con frecuencia muy difícil. Por ello se puede realizar empleando sondas dirigidas a secuencias repetidas en el ADN de la bacteria a analizar, de forma que las bandas que se detecten posteriormente sean solo las que contengan esa secuencia diana. Así, tras la electroforesis los fragmentos de ADN ya separados se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa mediante un *Southern blotting* y se unen a esa membrana mediante una exposición a rayos ultravioleta. Por último, esos fragmentos son hibridados con la sonda elegida, que ha sido marcada, de forma que se obtiene un patrón de bandas que corresponde con las copias que existen de la secuencia con la que hibrida dicha sonda en el genoma bacteriano.

El empleo de las secuencias de inserción ha demostrado una gran utilidad en este sentido, simplificando la interpretación de los resultados pero conservando un buen poder de

discriminación. En los últimos 20 años han sido descritas numerosas secuencias de inserción en cepas pertenecientes a MAC, aunque el espectro de distribución de muchas de ellas sigue siendo una incógnita, pues no se han encontrado más que en ocasiones aisladas y de un porcentaje pequeño de cepas, y por tanto su aplicación en la caracterización del complejo *avium* está por determinar (Turenne *et al.*, 2007). Por lo tanto a continuación se detallarán solo las secuencias de inserción que han demostrado su utilidad en estudios de tipificación molecular de MAC.

5.5.1. IS1245

Esta secuencia de inserción, perteneciente a la familia IS256, fue descrita por primera vez en 1995 por Guerrero y colaboradores (Guerrero *et al.*, 1995). Es un elemento de 1414 pares de bases que está flanqueado por dos secuencias invertidas repetidas (Código Genbank L33879). En este trabajo se la describió como una secuencia de inserción específica de MAC, pues fue encontrada en todos los aislados de MAC estudiados (de 1 a 27 repeticiones) (*M. avium* subsp. *avium* – que entonces comprendía esta especie y *M. avium* subsp. *hominissuis* – *M. avium* subsp. *silvaticum* y *Map*) y en ninguna de las otras 18 especies de micobacterias que fueron analizadas. Los aislados procedentes de muestras humanas y porcinas (que presumiblemente serían *M. avium* subsp. *hominissuis*) presentaron un elevado número de repeticiones de esta secuencia, mientras que los aislados de aves tenían solo tres copias. La diferente distribución de IS1245 en aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis*, normalmente cultivados de muestras humanas, porcinas y ambientales, y *M. avium* subsp. *avium* (aislados a partir de muestras de aves) ha sido confirmada después mediante RFLP [normalmente siguiendo el protocolo propuesto por Van Soolingen y colaboradores (van Soolingen *et al.*, 1998)] en numerosos trabajos (Roiz *et al.*, 1995; Bono *et al.*, 1995; Picardeau *et al.*, 1997b; Ritacco *et al.*, 1998; Pestel-Caron y Arbeit, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Komijn *et al.*, 1999; Hazra *et al.*, 2000; Novi *et al.*, 2000; Dvorska *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Thegerstrom *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Mobius *et al.*, 2006; Johansen *et al.*, 2007; Tirkkonen *et al.*, 2007).

Posteriores estudios han demostrado, no obstante, que la distribución de este elemento propuesta por Guerrero y colaboradores era incorrecta: por una parte, *Map* no tiene ninguna copia de este elemento; y *Mycobacterium avium* subsp. *avium* solo posee una repetición del mismo, no las tres que normalmente daban lugar al “perfil aviar” (*bird pattern*) (Johansen *et al.*, 2005). La explicación del error originario está en que la sonda utilizada para detectar el IS1245, de 427 pares de bases, contenía una secuencia con una identidad del 82% con otra secuencia de inserción presente en MAC, IS1311 (ver más adelante); por ello en ocasiones se producían hibridaciones cruzadas con este elemento, de distribución distinta: de esta forma, el perfil aviar

consistía en realidad en dos repeticiones de IS1311 y una de IS1245. Johansen y colaboradores resolvieron este problema diseñando una nueva sonda más corta situada en una región de menor homología con IS1311, que es específica de IS1245 y no da lugar a hibridaciones cruzadas (Johansen *et al.*, 2005).

Por otra parte, a lo largo de los años ha habido varios estudios que han descrito la aparición de aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis* procedentes de muestras humanas, animales o ambientales que no contenían ninguna copia de IS1245 (Ritacco *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Komijn *et al.*, 1999; Beggs *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2000b) aunque en algunos de ellos la identidad de las cepas de *M. avium* no fue confirmada mediante técnicas de secuenciación complementarias, y por tanto puede que no fueran realmente *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Por último, mediante PCRs se ha demostrado la presencia de IS1245 (o de elementos homólogos) en un espectro mayor de bacterias que el inicialmente planteado: así, Beggs y colaboradores encontraron este elemento en un 7% de aislados de *M. intracellulare* estudiados (Beggs *et al.*, 2000), y Keller y colaboradores lo detectaron también en cepas de *M. intracellulare*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum* y *M. nonchromogenicum* (Keller *et al.*, 2002). Sin embargo en dichos estudios no se secuenció por completo la secuencia de IS1245, por lo que puede que se estuvieran produciendo reacciones cruzadas con IS1311 o con otras secuencias homólogas.

La estabilidad de IS1245 *in-vivo* en una cepa parece, no obstante, bastante elevada, ya que en estudios realizados con aislados secuenciales de *M. avium* subsp. *hominissuis* procedentes de muestras humanas tomadas en periodos de hasta 5 años no se observaron cambios en los perfiles de RFLP (o cambios en solo una-dos bandas) en la mayoría de los casos (Ritacco *et al.*, 1998; Pestel-Caron y Arbeit, 1998). En 2002 Dvorska y colaboradores encontraron 22 perfiles distintos de RFLP-IS1245 a partir de aislados de un mismo paciente; sin embargo en este caso la explicación más probable fue una infección policlonal, no una evolución de una misma cepa (Dvorska *et al.*, 2002). La estabilidad del elemento *in-vitro*, medida caracterizando subcultivos distintos de *M. avium* subsp. *hominissuis* procedentes de un mismo clon también fue considerable, pues no se observaron más que pequeñas diferencias de no más de dos bandas en los perfiles de RFLP de colonias obtenidas a partir de un mismo aislado a corto plazo (Pestel-Caron y Arbeit, 1998) o a lo largo de un periodo de un año (Bauer y Andersen, 1999).

5.5.2. IS1311

Esta secuencia de inserción es la más ampliamente distribuida en MAC, ya que ha sido detectada en todas las subespecies de *M. avium* (Collins *et al.*, 1997); no parece estar presente en *M. intracellulare* (Devallois y Rastogi, 1997; Whittington *et al.*, 1998), aunque se ha descrito algún resultado positivo aislado en esta especie y en otras micobacterias no pertenecientes a MAC (Keller *et al.*, 2002), tal vez producto de hibridaciones cruzadas con elementos homólogos. Fue publicada en el Genbank en 1994 (Código Genbank U16276), pertenece a la familia IS256 y tiene 1317 pares de bases de longitud. Su amplia distribución en MAC hace que se especule con que su origen sea anterior a la división en subespecies de *M. avium* (Turenne *et al.*, 2007).

Este elemento ha sido utilizado en estudios de caracterización molecular, fundamentalmente a través de dos técnicas: IS1311 ha sido empleado como sonda para realizar técnicas de RFLP, generalmente con un poder de discriminación similar o ligeramente inferior al obtenido al utilizar IS1245 como sonda (Collins *et al.*, 1997; Devallois y Rastogi, 1997; Dvorska *et al.*, 2002; Johansen *et al.*, 2007), aunque su elevado nivel de homología con IS1245 hace que en ocasiones los resultados sean difíciles de interpretar debido a la aparición de bandas débiles producto de hibridaciones cruzadas.

La segunda técnica de tipificación molecular que tiene el IS1311 como diana es la restricción enzimática de producto de PCR (PCR-REA), capaz de detectar SNPs puntuales propios de subespecies y de tipos de micobacterias: así, Whittington y colaboradores describieron 5 polimorfismos puntuales entre *M. avium* y *Map*; a su vez, dentro de los aislados de ésta última analizados, describieron otro SNP capaz de diferenciar los aislados de tipo ovino (S o *sheep*, o Tipo I) de los bovinos (C o *cattle*, o Tipo II) (Whittington *et al.*, 1998). Basándose en esas mutaciones Marsh y colaboradores diseñaron el sistema de PCR-REA capaz de diferenciar, mediante una PCR dirigida a un fragmento de 608 pb y su subsiguiente digestión mediante las enzimas de restricción *HinfI* y *MseI*, aislados de *M. avium*, de *Map* S (Tipo I) y de *Map* C (Tipo II) (Marsh *et al.*, 1999). Esta técnica se ha aplicado en varios estudios epidemiológicos de caracterización molecular de *Map* (Whittington *et al.*, 2000b; Whittington *et al.*, 2001b; Corn *et al.*, 2005; Sevilla *et al.*, 2005), lo que ha llevado al descubrimiento de nuevos perfiles de IS1311-REA: en 2001 Whittington describió un tercer perfil intermedio entre el S y el C, y que podía ser diferenciado mediante la PCR-REA, denominado B (o *bison*) al analizar mediante esta técnica cepas de *Map* aisladas de bisontes en Montana (EEUU), (Whittington *et al.*, 2001a). Un estudio posterior realizado en fauna salvaje describió la existencia de otro nuevo perfil de IS1311-REA, presente en tres cepas de *Map* aisladas a partir de muestras de armadillos (Corn *et al.*, 2005).

5.5.3. IS900

Fue la primera secuencia de inserción descrita en aislados pertenecientes al complejo *avium* (Green *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1989), y pertenece a la familia IS110, que se caracteriza por no tener repeticiones inversas y no generar repeticiones directas (McAdam *et al.*, 2000). Su longitud es de 1453 pb (Código Genbank AF416985), y en su secuencia codifica dos proteínas: la transposasa p43, de 399 aminoácidos, en una hebra de ADN (Tizard *et al.*, 1992), y la proteína Hed, de función aún desconocida, en la cadena complementaria (Doran *et al.*, 1994; Bull *et al.*, 2000a). Ha sido sin duda la diana más utilizada en las técnicas de biología molecular aplicadas con el fin de detectar y caracterizar aislados de *Map*: desde su descripción se la consideró una secuencia de inserción específica de esta especie, ya que está presente en un número total de 15-20 copias en todos los aislados de *Map* pero no fue detectada en otras especies de MAC (Collins *et al.*, 1989) ni en otras bacterias (Moss *et al.*, 1991); por ello rápidamente se diseñaron técnicas de PCR directa para su detección en muestras clínicas (Vary *et al.*, 1990), y posteriormente PCR anidada (*nested* PCR) (Collins *et al.*, 1993), PCR *in situ* (Sanna *et al.*, 2000) y PCR a tiempo real (Fang *et al.*, 2002).

La secuencia de IS900 también ha sido empleada como sonda para realizar técnicas de RFLP en aislados de *Map* (Whipple *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1990a; de Lisle *et al.*, 1992; Bauerfeind *et al.*, 1996). Estos estudios proporcionaron una gran información epidemiológica sobre *Map*, ya que dividieron los aislados analizados en dos grandes grupos, el bovino (o *cattle*, o C) y el ovino (o *sheep* o S) (pág. 20). Sin embargo la comparación interlaboratorial de los resultados fue a veces compleja debido a la falta de estandarización de la técnica y a la ausencia de una nomenclatura compartida. Por ello en 1999 Pavlik y colaboradores describieron un protocolo para estandarizar esta técnica empleando las enzimas de restricción *Pst*I y *Bst*II, obteniendo 28 perfiles distintos (Pavlik *et al.*, 1999). La enzima *Bst*II dividió los aislados en 25 perfiles agrupados en tres grupos, C (perfiles C1-C20), S (S1-S3) e I (I1-I2), que coinciden con los tres grandes grupos obtenidos al realizar técnicas de campo pulsado (pág. 73). Posteriormente Cousins y colaboradores realizaron otro estudio de RFLP-IS900 empleando más enzimas de restricción para incrementar el poder de discriminación de la técnica (Cousins *et al.*, 2000), aunque la mayoría de estudios siguen empleando *Pst*I y *Bst*II preferentemente.

Los problemas relacionados con el empleo de IS900 como diana de técnicas diagnósticas basadas en PCR radican en la aparición de fragmentos de ADN similares a esta secuencia (IS900-*like*) presentes en otras micobacterias distintas de *Map*: así, en aislados identificados como *M. scrofulaceum*, *M. spp* (cepa 2333, relacionada con *M. cooki*), *M. Marínium*, *M. terrae*, *M. chelonae* y *M. xenopi* se detectaron mediante técnicas de PCR dirigidas a IS900 fragmentos iguales a los

esperados en cepas de *Map* (Cousins *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Tasara *et al.*, 2005). Falsos positivos debidos a secuencias *IS900-like* han sido también descritas en otros miembros de MAC (Naser *et al.*, 1999b; Motiwala *et al.*, 2003). Estos hallazgos cuestionan la fiabilidad del uso de técnicas diagnósticas basadas exclusivamente en la detección de este elemento móvil. Para evitar estos problemas se han diseñado oligonucleótidos dirigidos a zonas más específicas de la secuencia de inserción o bien sistemas de detección basados en otras secuencias de ADN específicas de *Map* (Vansnick *et al.*, 2004).

Otra solución para la diferenciación de falsos positivos a causa de la existencia de secuencias *IS900-like* es la secuenciación de las mismas. Sin embargo, debido a la aparición de distintas secuencias de *IS900* en aislados de *Map* (Naser *et al.*, 2004; Pickup *et al.*, 2005; Sivakumar *et al.*, 2005; Bhide *et al.*, 2006) diferenciables por uno o más SNPs respecto a la secuencia original (Green *et al.*, 1989) o a las secuencias encontradas en el genoma de la cepa k10 (Li *et al.*, 2005) en ocasiones puede ser difícil determinar cuál debe ser la referencia. Por ello, Semret y colaboradores propusieron como referencia la cepa k10, y secuenciaron un panel de 23 aislados de *Map* procedentes de distintas especies animales y localizaciones geográficas (Semret *et al.*, 2006b): todas las cepas de tipo II contenían repeticiones de *IS900* idénticas a las publicadas en el genoma de *Map* k10. Por el contrario, todas las cepas de tipo I presentaban secuencias de *IS900* con dos SNPs respecto a las de k10 (Behr y Mostowy, 2007).

5.5.4. *IS901*

En 1991 Kunze y colaboradores describieron esta nueva secuencia de inserción, de 1472 pb, y presente solo en una parte de los aislados de *M. avium* analizados, los que demostraron mayor virulencia en infecciones experimentales en ratones (Kunze *et al.*, 1991) (código genbank X59272). Pertenece a la misma familia que *IS900*, la *IS110*, pero solo comparte con ésta un 60% de homología (Kunze *et al.*, 1991). Posteriores estudios confirmaron la utilidad de este elemento como marcador de cepas de *M. avium* más virulentas en infecciones en ratones (Pedrosa *et al.*, 1994), pollos (Pavlik *et al.*, 2000c; Dvorska *et al.*, 2003), ciervos, cerdos y vacas (Collins *et al.*, 1997; Ocepek *et al.*, 2003).

Por todo ello *IS901* ha sido empleado como diana de técnicas de caracterización molecular de aislados de MAC procedentes de muestras humanas, animales y ambientales en numerosos estudios: por un lado, se han diseñado estrategias de detección del elemento empleando técnicas de PCR (Kunze *et al.*, 1992; Bono *et al.*, 1995; Ahrens *et al.*, 1995; Pavlik *et al.*, 2000c; Bartos *et al.*, 2006; Moravkova *et al.*, 2007); por otro lado, ha sido empleado como sonda para técnicas de RFLP en numerosos estudios (Ritacco *et al.*, 1998; O'Grady *et al.*, 2000;

Machackova *et al.*, 2004; Dvorska *et al.*, 2004; Mobius *et al.*, 2006; Dvorska *et al.*, 2007; Shitaye *et al.*, 2008). En 2003, Dvorska y colaboradores propusieron un protocolo estandarizado para la realización de RFLP-IS901 empleando las enzimas de restricción *PvuII* y *PstI*, encontrando un total de 52 perfiles en 173 aislados (Dvorska *et al.*, 2003).

Mediante el uso de ambas técnicas (PCR y RFLP) se confirmaron los hallazgos iniciales de Kunze y colaboradores, que ligaban la presencia de IS901 con una mayor virulencia y que se encontraba mayoritariamente en cepas de *M. avium* aisladas a partir de muestras aviares, y raras veces en aislados de muestras humanas, porcinas o ambientales. Además todos los aislados que contienen este elemento en su genoma presentan un mismo perfil de RFLP-IS1245, definido como “tipo aviar” (Ritacco *et al.*, 1998), caracterizado por tres bandas (pág. 67). Estas diferencias entre aislados contribuyeron a la diferenciación de la antigua *M. avium* subsp. *avium* (Thorel *et al.*, 1990) en dos nuevas subespecies, *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *hominissuis*, uno de cuyos rasgos definitorios es la ausencia de IS901 en su genoma (Mijls *et al.*, 2002).

5.5.5. IS902

Esta secuencia fue publicada en 1992, casi simultáneamente a la descripción de IS901, como un elemento de 1470 pb que codificaba una proteína de 400 aminoácidos y formaba parte de la familia IS110, pero tenía un bajo nivel de homología con otros miembros de esta familia, como IS900 (Moss *et al.*, 1992a). Se la definió como un elemento específico de *M. avium* subsp. *silvaticum*, y fue utilizada en subsiguientes estudios como diana de técnicas de PCR para diferenciar dicha subespecie de otras especies de MAC como *Map* (Moss *et al.*, 1992b), aunque su presencia no fue evaluada en otras especies del complejo distintas de *Map*.

Sin embargo la elevada homología existente entre IS902 y IS901, por encima del 99%, y la naturaleza de las diferencias entre ellos alienta la hipótesis de que probablemente estos dos elementos son en realidad el mismo, y por tanto no se podrían identificar aislados como *M. avium* subsp. *silvaticum* basándose en la presencia de IS902 en su ADN (Turenne *et al.*, 2007).

5.6. Otras técnicas de caracterización molecular

A lo largo de las dos últimas décadas las técnicas de biología molecular han evolucionado a gran velocidad, por lo que, a pesar de que a principios de los 90 las estrategias para caracterizar y comparar aislados de micobacterias eran comparativamente bastante reducidas, hoy en día se dispone de un mayor número de herramientas. Además, la secuenciación completa de los genomas de *Map* k10 (Li *et al.*, 2005) y de *M. avium* 104 (The Institute for

Genomic Research, <http://www.tigr.org/>) ha abierto un nuevo abanico de dianas para las técnicas moleculares, derivadas de la comparación inter-genómica de elementos para la determinación de secuencias-genes-regiones específicos de especie o subespecie de micobacteria. Al igual que se hizo con las técnicas aplicadas en el complejo *M. tuberculosis* (Behr y Mostowy, 2007), podemos dividir las siguientes técnicas en “pre-genómicas” y “post-genómicas”, entendiendo por estas últimas aquellas dirigidas a la detección de grandes diferencias existentes entre especies o subespecies bacterianas en forma de LSPs que, de algún modo, “marquen” a la bacteria que las posea.

5.6.1. Técnicas pre-genómicas

5.6.1.1. PFGE

De las técnicas pre-genómicas la electroforesis en campo pulsado o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) es la que lleva más tiempo aplicándose. Está basada en el análisis de todo el cromosoma bacteriano después de ser sometido a una digestión enzimática. Así, el ADN de la bacteria se embebe en bloques de agarosa y posteriormente se somete a un protocolo de lisis química para liberar el ADN, que queda distribuido de forma más o menos homogénea por los bloques. Se aplica entonces la enzima de restricción de elección (de puntos de corte infrecuentes) y se aplica una electroforesis multidireccional sobre el ADN digerido durante un periodo de tiempo determinado. Mediante la electroforesis de campo pulsado pueden separarse fragmentos de gran tamaño (hasta 10Mb) que darán lugar a perfiles característicos, mientras que con la electroforesis convencional no pueden separarse bandas de más de 50kb. Así, los distintos patrones de bandas son consecuencia de fenómenos genéticos tales como mutaciones que crean o eliminan puntos de corte de la enzima, o inserciones o deleciones que incrementan o disminuyen el tamaño de una banda (Tenover *et al.*, 1995).

Esta técnica ha sido aplicada con éxito en diversas especies de micobacterias, entre las que podemos destacar el complejo *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1992; Kristjansson *et al.*, 1993; Feizabadi *et al.*, 1996b; Singh *et al.*, 1999), *M. fortuitum* (Burns *et al.*, 1991; Hector *et al.*, 1992; Legrand *et al.*, 2002), *M. kansasii* (Zhang *et al.*, 2004), *M. abscessus* y *M. chelonae* (Wallace, Jr. *et al.*, 1993), *M. malmoense* (Doig *et al.*, 2002), y *M. phlei* (Coffin *et al.*, 1992), entre otros muchos estudios.

En lo referente a MAC, desde que Levy-Frebault y colaboradores lo utilizaran por primera vez para caracterizar cepas de *Map* junto con aislados de pacientes de Crohn y cepas de *M. avium* (Levy-Frebault *et al.*, 1989), el PFGE ha sido empleado para tipificar aislados de las

distintas subespecies comprendidas en MAC (Coffin *et al.*, 1992), para relacionar aislados clínicos de *M. avium* entre sí (Burki *et al.*, 1995; Picardeau *et al.*, 1997b; Pestel-Caron *et al.*, 1999; Hazra *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2000b) y para comparar cepas clínicas con aislados ambientales (Von Reyn *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1999; Tobin-D'Angelo *et al.*, 2004).

Mención aparte merecen los estudios desarrollados en cepas de *Map*: en 1997 se publicó el primer trabajo de PFGE aplicado a un panel de cepas de *Map* (35 aislados de bovinos, alpacas, ovinos y caprinos provenientes de Australia) empleando tres enzimas de restricción (*DraI*, *XbaI* y *SpeI*), pudiendo diferenciar las cepas en dos grupos fundamentalmente mediante el uso de las dos últimas enzimas (Feizabadi *et al.*, 1997). En un estudio publicado dos años después aplicando las enzimas *HindIII* y *SpeI* para la comparación de aislados de conejos y vacas que procedían de las mismas áreas, el PFGE no pudo detectar ninguna diferencia entre ellos, lo que sirvió para reforzar la hipótesis de que había un riesgo de transmisión interespecífica (Greig *et al.*, 1999). Con el fin de evaluar las diferencias existentes entre cepas pigmentadas y no pigmentadas de *Map*, Stevenson y colaboradores realizaron en 2002 un análisis de PFGE a 5 aislados pigmentados (procedentes de ovino) y 88 no pigmentados (aislados de un amplio rango de especies, incluyendo especies silvestres) empleando las enzimas *SnaBI* y *SpeI* (Stevenson *et al.*, 2002), pudiendo agrupar los perfiles en dos grandes grupos que coincidían con la presencia o ausencia de pigmentación de los aislados. De Juan y colaboradores aplicaron por primera vez esta técnica a un número elevado de aislados caprinos de *Map*, comparando su poder de discriminación con el obtenido al emplear RFLP-IS900, que resultó menos eficaz (de Juan *et al.*, 2005). Por último, en un reciente estudio, Sevilla y colaboradores caracterizaron mediante PFGE un panel de 269 aislados procedentes de varias especies animales, encontrando características diferenciales en algunos aislados procedentes de cabras y ovejas españolas (Sevilla *et al.*, 2007).

A pesar de la demostrada utilidad de esta técnica, derivada de su gran poder de discriminación, presenta algunos inconvenientes que impiden su uso como prueba de rutina de forma más generalizada en laboratorios de micobacterias: es un método laborioso, que necesita personal especializado, y sobre todo requiere grandes cantidades de ADN; a pesar de las mejoras conseguidas en la obtención de una mayor concentración de material genético a partir de cultivos (Hughes *et al.*, 2001), se sigue necesitando un considerable crecimiento bacteriano para la aplicación del PFGE. Esto representa una gran desventaja especialmente en el caso de micobacterias con requerimientos especiales de cultivo y de crecimiento lento y fastidioso, tales como las cepas de Tipo I y III de *Map* (Juste *et al.*, 1991; de Juan *et al.*, 2006b).

5.6.1.2. VNTRs, SSRs y MIRUs

Otra técnica de creciente aplicación en miembros del complejo *M. avium* es la que se basa en los “números variables de repetición en tándem” o **VNTRs** (*Variable Number of Tandem Repeats*): una repetición en tándem es una secuencia corta de ADN de 14 a 100 nucleótidos normalmente (**SSR**, *Short Sequence Repeats*) que se repite consecutivamente (de 4 a 40 veces), cabeza con cola, en un *locus* específico; el número de unidades repetidas puede variar en distintas cepas, y por tanto la determinación de ese número de repeticiones puede ser una herramienta para la caracterización de aislados. De hecho, el análisis de estas SSRs permite obtener información con fines epidemiológicos pero también sobre funcionalidad de ciertos genes (van Belkum A., 1999). En el caso de las micobacterias, las repeticiones en tándem pueden conformar lo que se denomina como “unidades micobacterianas repetitivas intercaladas” (**MIRUs**, *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*); éstas fueron estudiadas en primer lugar en el complejo *M. tuberculosis* y en *M. leprae* (Supply *et al.*, 1997; Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998), donde se han seguido aplicando como un método eficaz para caracterizar aislados y realizar estudios evolutivos (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001; Savine *et al.*, 2002; Supply *et al.*, 2003).

Bull y colaboradores estudiaron la presencia de estos MIRUs en el material genético de *M. avium*, *Map* y *M. intracellulare*, e identificaron 6 *loci* en los que, mediante PCRs, podían diferenciarse las tres bacterias e incluso las cepas pigmentadas de *Map* de las no pigmentadas (Bull *et al.*, 2003b). Un análisis en profundidad de la secuencia del genoma de *Map* k10 y de *M. avium* 104 permitió a Overduin y colaboradores diseñar un sistema de análisis simultáneo de VNTRs en 5 *loci* distintos (MVLA, *Multilocus-VNTR typing analysis*) que fue aplicado en 49 aislados de *Map* previamente caracterizados mediante RFLP-IS900 (Overduin *et al.*, 2004). La discriminación obtenida en el conjunto de aislados mediante el MVLA fue menor, pero demostró su utilidad al poder subdividir el perfil más representado de RFLP-IS900 del estudio en 6 tipos. Nishimori y colaboradores estudiaron 17 *loci* para estudiar 678 aislados de *Map* de Japón, subdividiéndolos en 12 perfiles de VNTRs (Nishimori *et al.*, 2007).

En una aproximación similar, Motiwala y colaboradores exploraron el genoma completo de *Map* k10, encontrando 78 SSRs-*loci* susceptibles de ser utilizados en PCRs para valorar su variabilidad (Amonsin *et al.*, 2004). Tras una fase preliminar en la que se analizaron esos 78 SSR-*loci* en seis cepas de *Map*, se seleccionaron 11 (los más polimórficos) para su posterior estudio en un panel de 33 aislados de *Map* mediante PCR y secuenciación (**MLSSR**, *Multilocus Short Sequence Repeat*). Los resultados fueron muy prometedores, ya que esos 33 aislados quedaron divididos en 20 tipos de MLSSR, obteniéndose una mayor discriminación que con otras técnicas

que habían sido utilizadas previamente (MPIL y AFLP, ver más adelante). El MLSSR demostró ser una técnica muy discriminativa, rápida, y que permite comparaciones interlaboratoriales al estar basada en PCR y secuenciación; además no precisa de grandes cantidades de ADN, lo que la hace muy útil en ciertos aislados de Tipo I y III de *Map* difíciles de cultivar. En sucesivos estudios se han analizado algunos de los *loci* descritos como más polimórficos en aislados de *Map* cultivados a partir de muestras bovinas (Motiwala *et al.*, 2005), de animales salvajes (Motiwala *et al.*, 2004; Corn *et al.*, 2005) y de pacientes de Crohn (Ghadiali *et al.*, 2004). Hasta ahora el MLSSR ha demostrado un mayor poder de discriminación que otras técnicas aplicadas anteriormente, como el IS900-RFLP, el MPIL o el AFLP (Amonsin *et al.*, 2004).

En otro estudio Thibault y colaboradores realizaron también un análisis exhaustivo del genoma de *Map* k10, describiendo 8 nuevas repeticiones en tándem (TR, *Tandem Repeats*) y *loci* de MIRUs polimórficos en aislados de *Map* y, por tanto, posibles dianas para caracterización molecular de cepas (Thibault *et al.*, 2007). Al estudiar en 183 cepas de *Map* aisladas de distintos hospedadores en distintos países el poder discriminativo de esos 8 marcadores frente al del RFLP-IS900 se obtuvo un valor similar (21 tipos de MIRU-VNTRs frente 26 perfiles de RFLP, aunque los primeros estaban distribuidos de forma más homogénea entre los aislados). La mayor discriminación se obtenía al combinar ambas técnicas, concluyéndose por tanto que resultaban complementarias. Los ocho marcadores descritos fueron además evaluados en cepas de *M. avium*, encontrándose una mayor variabilidad genética que en *Map* a pesar de que solo se analizaron 82 aislados del mismo país (Francia) cultivados de muestras clínicas humanas (Thibault *et al.*, 2007).

5.6.1.3. AFLP

Esta técnica, de muy reciente diseño, se basa en la digestión del genoma bacteriano normalmente empleando dos enzimas, una con puntos de restricción frecuentes y otra con pocas dianas de restricción. A continuación se produce una hibridación con una serie de oligonucleótidos diseñados para ser complementarios a las regiones que flanquean los puntos de restricción de las enzimas, y una amplificación mediante reacciones de PCR a partir de esos cebadores. Los fragmentos obtenidos se pueden visualizar en geles de poliacrilamida o mediante fluorescencia (Vos *et al.*, 1995; Motiwala *et al.*, 2006). Aunque se ha utilizado en la caracterización de aislados de *M. kansasii* (Picardeau *et al.*, 1997a; Gaafar *et al.*, 2003), *M. ulcerans* y *M. Marínium* (Huys *et al.*, 2000; Chemlal *et al.*, 2001), y del complejo *M. tuberculosis* (Huys *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003), la primera aplicación de esta técnica a bacterias pertenecientes a MAC se produjo en 2003, cuando se analizaron 86 aislados de *Map* y 16 de *M.*

avium mediante las enzimas *EcoRI* y *MseI* (Motiwala *et al.*, 2003). Se obtuvieron 26 perfiles de AFLP, aunque el 72% de los aislados correspondieron a los dos perfiles mayoritarios. La mayor homogeneidad se obtuvo en aislados de *Map* cultivados de vacuno, mientras que los aislados ovinos y humanos demostraron una mayor heterogeneidad.

Un grado mayor de polimorfismo fue obtenido al aplicar el AFLP con las enzimas *PstI* y *MseI* y un total de 96 pares de oligonucleótidos a un panel de 21 aislados de *Map* y 2 *M. avium* (O'Shea *et al.*, 2004): se identificaron 11 genotipos diferentes entre los aislados de *Map*, y cuatro regiones presentes en la mayoría de los aislados de *Map* y ausentes en los de *M. avium*. Aunque el número de cepas incluidas en este estudio es bajo, los autores concluyeron que el polimorfismo existente entre los aislados clínicos de *Map* es mayor que el descrito anteriormente (Motiwala *et al.*, 2003). Sin embargo, en un estudio posterior realizado sobre 56 aislados de *Map* procedentes de bovinos de Minnesota (EEUU) se encontró una diversidad limitada entre los mismos, con 11 tipos de AFLP (representando el más abundante el 51.8% del total de aislados estudiados) (Kiehnbaum *et al.*, 2005).

El AFLP también ha sido empleado para caracterizar aislados de otras especies de MAC procedentes de fuentes humanas y animales: Schrenzel y colaboradores analizaron 70 cultivos de *M. avium* y 15 de *M. intracellulare* procedentes de aves en cautividad encontrando una gran diversidad genética de aviarios comunes, lo que les llevó a concluir que la transmisión de animal a animal no era tan frecuente como se especulaba (Schrenzel *et al.*, 2008). Por su parte, Pfaller y colaboradores compararon los perfiles de 159 aislados de MAC cultivados a partir de pacientes y de muestras ambientales, sin encontrar ningún perfil común a ambas procedencias (Pfaller *et al.*, 2007). En este estudio el AFLP demostró un mayor poder de discriminación que el PFGE o el RFLP, y fue útil para identificar aislados de *M. intracellulare* mal clasificados por la sonda Accuprobe de Gen-Probe.

Aunque el AFLP ha demostrado ser una técnica útil para caracterizar cepas de MAC, su aplicación plantea algunos inconvenientes: la información que proporciona esta técnica sobre un determinado *locus* es limitada (presencia/ausencia de un punto de corte), y además es una técnica muy sensible a la calidad del ADN utilizado, lo que provoca problemas de repetitibilidad y variaciones interlaboratoriales (Bensch y Akesson, 2005).

5.6.1.4. RAPD

El análisis de ADN polimórfico amplificado de forma aleatoria (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) se basa en la amplificación arbitraria del ADN genómico mediante

oligonucleótidos de secuencia corta (10-22 bases) gracias a una hibridación poco específica, lo que garantiza la unión y posterior amplificación de numerosas secuencias del genoma, que luego serán visualizadas en geles mediante electroforesis en forma de bandas (Williams *et al.*, 1990). Los perfiles de bandas obtenidos, característicos de especie, subespecie o de cepa, han resultado útiles en estudios de micobacterias tales como *M. tuberculosis* (Linton *et al.*, 1994; Harn *et al.*, 1997), *M. abscessus* (Zhang *et al.*, 1997), *M. goodii* (Vogiatzakis *et al.*, 1998), *M. malmoense* (Kauppinen *et al.*, 1994) y *M. simiae* (Legrand *et al.*, 2000a).

La primera aproximación a miembros del complejo *avium* mediante este método fue realizada por Schleib y colaboradores en 1997 (Scheibl y Gerlach, 1997): analizaron 16 aislados de *Map* usando hasta 60 cebadores de 10 bases de longitud, de los que siete resultaron útiles para diferenciar algunos de los aislados. Sin embargo dejaron constancia de la baja reproducibilidad de los resultados al repetir los análisis de algunas cepas. Matsiota-Bernard y colaboradores describieron la utilidad del RAPD para detectar infecciones policlonales por *M. avium* en pacientes humanos, así como la variabilidad de perfiles encontrados en aislados sin relación epidemiológica (Matsiota-Bernard *et al.*, 1997). En otro estudio realizado en aislados de MAC de porcino y de humanos el RAPD fue capaz de diferenciar una cepa de *M. intracellulare* del resto de aislados de *M. avium*, y pudo diferenciar cepas agrupadas en un mismo serotipo; del mismo modo, la serotipificación también diferenciaba aislados con un mismo perfil de RAPD (Ramasoota *et al.*, 2001). En este trabajo el empleo de un kit comercial incrementó mucho la reproducibilidad de los resultados. Una comparación mediante RAPD de aislados sensibles a la claritromicina de ocho pacientes con otros resistentes a claritromicina obtenidos de los mismos pacientes después de sufrir recaídas tras tratamientos con este antibiótico demostró que en el 75% de los casos la cepa final estaba estrechamente relacionada con la inicial, lo que implica un desarrollo de resistencia; en el 25% restante de los casos se produjo una reinfección con otra cepa distinta (Matsiota-Bernard *et al.*, 2000; Ramasoota *et al.*, 2001). Pillai y colaboradores eligieron un oligonucleótido (OPE-20) para analizar mediante RAPD 212 aislados de *Map* y 8 aislados de *M. avium* subsp. *avium*, obteniendo perfiles legibles para todos ellos (Pillai *et al.*, 2001); los resultados permitieron diferenciar las dos subespecies y remarcaron la mayor diversidad existente en *M. avium* subsp. *avium* (6 genotipos a partir de 8 aislados) respecto a *Map* (6 genotipos en 212 aislados). Por último, Schrenzel y colaboradores usaron este método junto con el AFLP y la secuenciación de ITS en aislados de *M. avium* subsp. *avium* y *M. intracellulare* de aves en cautividad, obteniendo resultados coincidentes con las tres técnicas si bien el RAPD fue más consistente que el AFLP.

En resumen, esta técnica presenta algunas ventajas frente a otras técnicas tradicionales como el RFLP o el PFGE ya que es más sencilla, no requiere un conocimiento previo del genoma del organismo a utilizar y es rápida. Los problemas de reproducibilidad inherentes a la técnica pueden minimizarse usando kits comerciales y purificando el ADN antes de realizar la PCR (Ramasoote *et al.*, 2001; Pillai *et al.*, 2001). Sin embargo la fiabilidad de los resultados está íntimamente ligada a la calidad del ADN analizado, y los estudios realizados en aislados de *Map* no han revelado de momento una gran variabilidad.

5.6.1.5. MPIL

Este método está basado en el estudio de los lugares de inserción del elemento IS900. En el año 2000 Bull y colaboradores estudiaron las secuencias que flanqueaban 14 inserciones de IS900 en *Map*, y diseñaron una PCR múltiple dirigida hacia esos *loci* (MPIL, *Multiplex PCR of IS900 loci*) (Bull *et al.*, 2000a). El análisis de 81 aislados de *Map* mediante este método reveló, por una parte, la conservación de 7 de los 14 *loci* analizados en todos los aislados independientemente de su hospedador; por otra parte, se dividieron los 80 cultivos en 10 tipos, en contraste con los 17 perfiles en los que se dividía ese mismo panel mediante RFLP-IS900. También puso en evidencia las diferencias existentes entre cepas aisladas de ovino y las provenientes de bovinos u otras especies.

Posteriormente aplicaciones de esta técnica confirmaron los hallazgos descritos anteriormente: se encontró una gran uniformidad en los perfiles de aislados de *Map* tipo II independientemente de su procedencia, con un 88% de cepas aisladas de animales salvajes (Motiwala *et al.*, 2004) y un 78% de cultivos de humanos y rumiantes domésticos (Motiwala *et al.*, 2003) mostrando el mismo tipo (A18); por otro lado, el poder de discriminación de la técnica fue menor al del MLSSR (Amonsin *et al.*, 2004), aunque sus resultados complementaban los del AFLP (Motiwala *et al.*, 2003). Esta técnica también permite la diferenciación entre miembros de MAC (Motiwala *et al.*, 2004).

Las ventajas de esta técnica radican en su aplicación en cepas de muy difícil cultivo, ya que requiere muy poca cantidad de ADN. Por desgracia el hecho de que haya un número limitado de inserciones de IS900 limita la diversidad esperable en las cepas de *Map* (Motiwala *et al.*, 2006); además MPIL y RFLP-IS900 describen los mismos fenómenos genéticos, pero el RFLP parece mostrar un mayor poder de discriminación (Bull *et al.*, 2000a), por lo que el MPIL no aporta ninguna información suplementaria a otras técnicas ya disponibles para la caracterización del complejo *avium* (Motiwala *et al.*, 2006).

5.6.2. Técnicas post-genómicas

Dentro de los grandes avances logrados a lo largo de las dos últimas décadas en el campo de la caracterización molecular de las micobacterias en general, y del complejo *avium* en particular, no se puede soslayar el gran impacto que supone la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de varios miembros de MAC.

Aunque ha sido la secuenciación completa de estos genomas lo que ha posibilitado la realización de estudios de genómica comparativa a gran escala, estudios realizados previamente mediante otras técnicas ya habían sido capaces de poner en evidencia algunas diferencias existentes entre distintos miembros del género *Mycobacterium*. La técnica de substracción genómica (*Genomic Subtraction*) permite identificar fragmentos ausentes en una cepa mutada respecto a otra cepa (Straus y Ausubel, 1990). Este procedimiento se aplicó con gran éxito en el complejo *M. tuberculosis*, poniendo en evidencia regiones del genoma presentes en cepas virulentas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* y ausentes en BCG (Mahairas *et al.*, 1996). Esta técnica también reveló nueve fragmentos de entre 318 y 596 pb presentes en *Map* y ausentes en otras micobacterias, siete de los cuales podían usarse para diferenciar esta bacteria de *M. avium* (Klitgaard y Ahrens, 2002).

Dentro del complejo *avium* se han producido numerosas aproximaciones empleando esta técnica: al valorar las diferencias en la capacidad de *M. avium* y *M. intracellulare* para causar infecciones en pacientes con SIDA, McGarvey y colaboradores observaron que *M. avium* tenía una mayor capacidad para invadir las células del epitelio intestinal; en un intento por identificar los genes implicados en la invasión de la mucosa intestinal la hibridación substractiva detectó 21 genes presentes en *M. avium* y ausentes en *M. intracellulare*, incluyendo algunos posibles causantes de esa diferencia fenotípica (McGarvey y Bermudez, 2001). De forma similar, Krzywinska y colaboradores intentaron mediante esta técnica detectar diferencias a nivel genómico que explicaran las diferencias en la virulencia de un aislado animal de MAC (*M. avium* subsp. *avium*) y uno humano (*M. avium* subsp. *hominissuis*), encontrando diferencias en genes implicados en la síntesis de glicopeptidolípidos (Krzywinska y Schorey, 2003)

Otra técnica de comparación genómica derivada de la anterior y aplicada en cepas del complejo *avium* es el análisis de representación de diferencias (RDA, *Representational Difference Analysis*). Gracias a ella se pudo detectar la secuencia ISMav2, una secuencia de inserción que hasta la fecha solo ha sido detectada en *Map* repetida al menos 3 veces (Strommenger *et al.*, 2001). También fue aplicado en 1998 por Tizard y colaboradores, poniendo en evidencia un elemento genético llamado GS, con un bajo contenido en G+C, similar a islas de patogenicidad

descritas en otras especies; este fragmento, presente en *Map*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y algunos aislados de *M. avium* subsp. *avium*, y posiblemente ausente en *M. avium* subsp. *hominissuis*, contenía genes homólogos de otras bacterias implicados en la síntesis de lipopolisacáridos (Tizard *et al.*, 1998).

En otro estudio realizado mediante RDA comparando el genoma de *Map* frente al de *M. avium*, y el de aislados de *Map* de tipo I y de tipo II, se encontraron tres fragmentos específicos de *Map* y ausentes en *M. avium* (RDI130, RDII60 y RDIII10) con tamaños entre 456 y 652 pb (Dohmann *et al.*, 2003). Uno esos fragmentos (RDI130) podía diferenciar también entre aislados de tipo I y II de *Map*, ya que en los primeros aparecían 11 nucleótidos adicionales ausentes en todas las cepas de tipo II. Esta investigación no pudo detectar fragmentos presentes en cepas de tipo II y ausentes en las de tipo I, pero por el contrario sí estableció la presencia de tres regiones de ADN específicas del tipo I, pig-RDA10, pig-RDA20 y pig-RDA30, que tenían un 98% de homología con secuencias de *M. avium* subsp. *hominissuis* (Dohmann *et al.*, 2003). Esto hizo que los autores especularan con la posibilidad de que el tipo I fuera un estado de evolución intermedio entre *M. avium* y *Map* tipo II. En otro estudio llevado a cabo por Stratmann y colaboradores el RDA permitió la detección de una región de 38 kb específica de *Map* cuya ausencia en *M. avium* y en otras micobacterias comprobaron posteriormente (Stratmann *et al.*, 2004). Estudiando los genes presentes en esa región la describieron como una posible isla de patogenicidad, lo que explicaría su ausencia de otras micobacterias saprofitas. Por último, Marsh y Whittington descubrieron mediante RDA un fragmento presente en una cepa de tipo II que no se conservaba en el genoma de la cepa de tipo I analizada, al contrario de lo descrito por Dohmann y colaboradores anteriormente (Dohmann *et al.*, 2003); la secuencia comprendía 11584 nucleótidos y 10 genes, entre los que se encontraban algunos implicados en la síntesis de la pared bacteriana, virulencia y otras características fenotípicas, por lo que especularon con la posibilidad de que pudieran ser los causantes de las diferencias en los requerimientos de cultivo y la aparente preferencia de hospedador (Marsh y Whittington, 2005).

Conforme fue avanzando el nivel de conocimiento de los genomas de *Map* y *M. avium* se llevaron a cabo comparaciones parciales de regiones ya conocidas, describiéndose fragmentos de ADN presentes en una y ausentes en otra cuyos genes pudieran servir como dianas de nuevas técnicas de diagnóstico molecular: en un estudio preliminar, el laboratorio responsable de la secuenciación del genoma de *Map* k10 describió 21 genes específicos de esta especie, 8 de los cuales estaban integrados formando un cluster de 4.4 kb (Bannantine *et al.*, 2002). Los 21 genes fueron después clonados y expresados en cepas de *Escherichia coli*, y sus productos fueron evaluados en estudios con sueros de ratones y conejos sensibilizados frente a *Map*; cinco de las

proteínas producidas demostraron ser antigénicas, hecho confirmado después en vacas con paratuberculosis clínica (Bannantine *et al.*, 2004). En otro trabajo realizado por el mismo grupo se comparó el área del genoma que codifica el origen de la replicación (*oriC*) de *Map* con el de *M. avium*: sorprendentemente, dadas las grandes diferencias existentes entre ambas especies en sus tasas de replicación, se observó un alto grado de homología (Bannantine *et al.*, 2003). Por último, en otro estudio se analizaron las regiones ya completadas del genoma en busca de genes presentes en *Map*, sin homólogos en otras especies, que produjeran proteínas utilizables como dianas de técnicas de diagnóstico inmunológico que serían, por tanto, más específicas (Paustian *et al.*, 2004). Se lograron identificar varios genes, cuyas proteínas fueron producidas con éxito en cinco casos; cuatro de esas proteínas demostraron sus capacidades inmunógenas en ratones, conejos y vacas infectadas con paratuberculosis.

Una vez terminado el proceso de secuenciación de los dos genomas mencionados pudieron hacerse estudios comparativos a gran escala mediante técnicas de *microarrays* que representan el genoma completo de las bacterias a estudiar. La comparación de ambos genomas a grandes rasgos revela un cierto grado de homogeneidad, aunque se observa una diversidad mayor de la descrita entre miembros del complejo *M. tuberculosis*. Se aprecian tres regiones homólogas entre ambas subespecies, con dos grandes áreas de inversión intercaladas entre ellas y una menor situada cerca del extremo 5' (Figura 5).

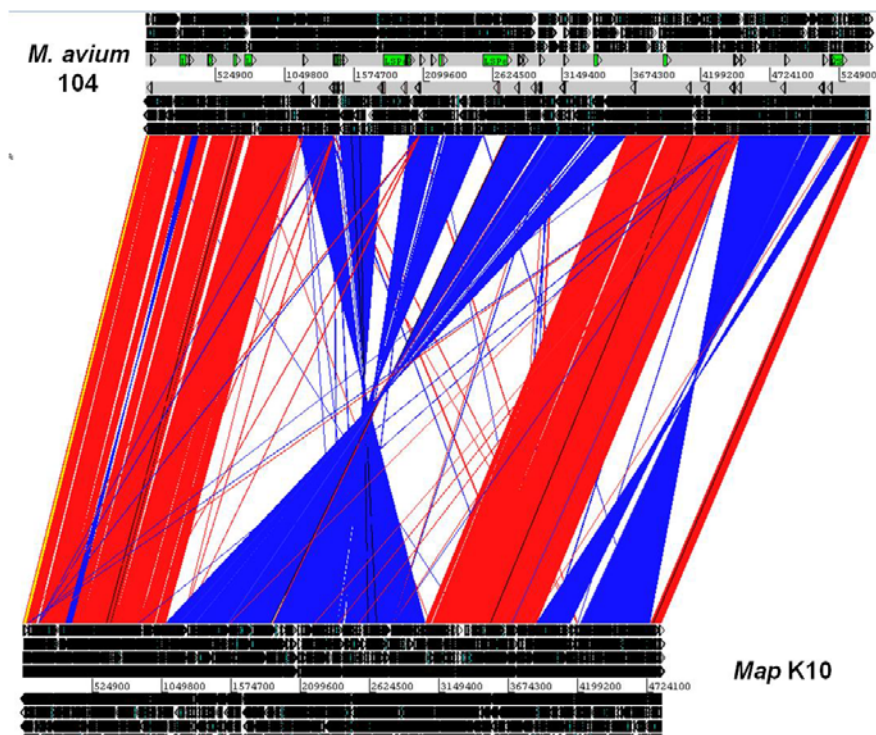


Fig. 5. Visualización de los genomas de *M. avium* 104 y *Map* k10 mediante el programa Artemis (www.sanger.ac.uk). Las zonas rojas indican homología, las azules zonas de inversión.

Hasta la fecha se han diseñado varios *arrays* usando alguno de los dos genomas disponibles, o una mezcla de ambos, como patrón con el que comparar las cepas a estudiar. Gracias a este método pueden evidenciarse polimorfismos de secuencia larga (LSP, *Large Sequence Polymorphisms*) entre una cepa patrón y una cepa problema. Estos LSPs pueden ser consecuencia de fenómenos simples de intercambio genético, tales como inserciones, deleciones o sustituciones (Fig. 6) o producirse a partir de cambios más complejos que impliquen una combinación de los anteriores, mucho más difíciles de determinar.

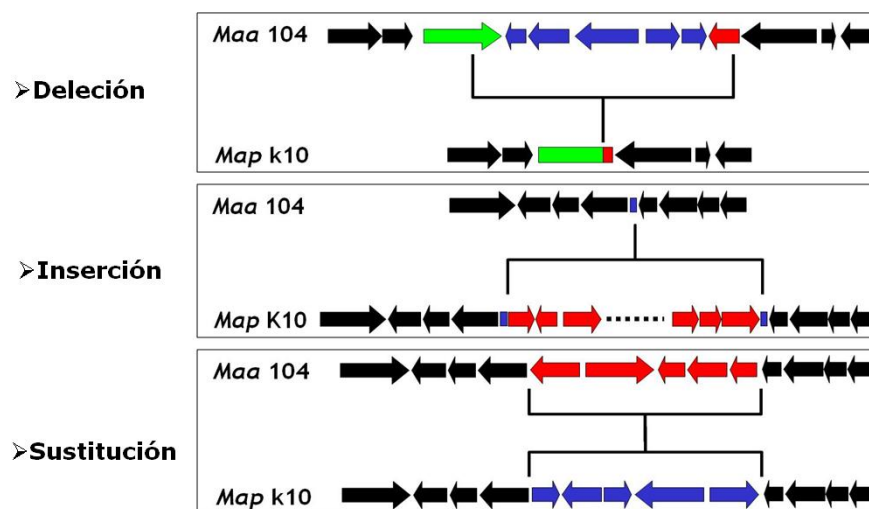


Fig. 6. Posibles fenómenos simples fuentes de LSPs (adaptado de D.C. Alexander, comunicación personal).

El primer análisis mediante *microarray* para el estudio de miembros del complejo *avium* fue llevado a cabo por Semret y colaboradores (Semret *et al.*, 2004), quienes desarrollaron un *array* basado en la secuencia sin anotar de *M. avium* 104, analizando 4158 marcos de lectura u ORFs (*Open Reading Frames*): examinaron con este *array* aislados de *M. avium* subsp. *silvaticum* y *Map* de tipo I y II, encontrando 14 LSPs, presentes en la cepa 104 y ausentes en el resto [denominados posteriormente LSP^As (Semret *et al.*, 2005) por encontrarse en *M. avium*] con tamaños comprendidos entre los 21 y los 197 kb y que codificaban 572 genes. Siete de los 14 LSP^As son consecuencia de fenómenos genéticos simples, tales como inserciones o deleciones, mientras que los 7 LSP^As restantes son el producto de una combinación más compleja de inserciones y deleciones. De ello se deduce que, a diferencia de lo que ocurre en el complejo *M. tuberculosis*, en MAC la transferencia horizontal es una importante fuente de variabilidad genética (Semret *et al.*, 2004). Al evaluar la presencia de estos LSP^As mediante PCRs en un panel

más amplio de aislados de todas las subespecies de *M. avium* se observó una gran variabilidad en los resultados excepto en *Map*; todos los LSP^As analizados estaban ausentes en todas las cepas de *Map* salvo el LSP^A11, ausente solo en algunos aislados ovinos.

Con el fin de encontrar LSPs específicos de *Map* y por tanto ausentes en otras subespecies de *M. avium* (denominados LSP^Ps) Semret y colaboradores analizaron el genoma de *Map* k10, y encontraron 17 posibles candidatos ausentes en la cepa 104. Con el fin último de poder aplicar la detección de alguno de estos elementos como herramienta de identificación diagnóstica de subespecie se determinó mediante PCRs la presencia de estos 17 LSP^Ps y de 3 LSP^As en 383 aislados de MAC (Semret *et al.*, 2005). Los resultados indicaron una vez más la gran diversidad genética observada en este complejo, ya que se observó una cierta variabilidad en la distribución de los LSP^Ps en las cepas de *Map*. No obstante, se concluyó que la ausencia del LSP^A8 y la presencia de LSP^P2, LSP^P4 y LSP^P5 podía considerarse específica de *Map* (aunque los LSP^Ps no eran 100% sensibles, esto es, un porcentaje de aislados de *Map* no los presentaban). Además, en este trabajo se concluyó que la isla de patogenicidad putativa descrita por Stratmann y colaboradores como específica de *Map* (Stratmann *et al.*, 2004), que codifica una proteína propuesta como diana de técnicas de inmunodiagnóstico (Paustian *et al.*, 2004) no estaba presente en todos los aislados de esta especie, y se encontraron secuencias homólogas en cepas de *M. avium*, cuestionando por tanto la utilidad de su detección directa o de sus productos (Semret *et al.*, 2005).

Por último, y gracias a la información precedente sobre la distinta distribución de ciertos LSPs en MAC, el mismo grupo propuso un sistema de PCRs basada en la detección sucesiva de regiones específicas de *M. avium* subsp. *hominissuis* (presencia de LSP^A8 y LSP^A17), *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y ciertas cepas de *M. avium* subsp. *hominissuis* (presencia de LSP^A8 y ausencia de LSP^A17), *Map* tipo I (ausencia de LSP^A8 y LSP^A20) y *Map* tipo II (ausencia de LSP^A8 y presencia de LSP^A20) que podía diferenciar las subespecies de *M. avium* basándose en el estudio de grandes regiones de ADN, marcadores genéticos más robustos que SNPs o secuencias de inserción (Semret *et al.*, 2006c) (Tabla 2, pág. 86).

En un estudio posterior, Wu y colaboradores emplearon otro *microarray* basado en la secuencia de *M. avium* 104 con iniciadores cortos, encontrando 24 LSPs entre *M. avium* y *Map* (MAV-1 a MAV-24), entre las que se encontraban las regiones polimórficas descritas anteriormente por Semret y colaboradores más 11 LSPs adicionales (Wu *et al.*, 2006). Otro hallazgo en el genoma de *M. avium* fue el elevado nivel de polimorfismo existente en la familia TetR de reguladores transcripcionales, algunos de cuyos miembros pueden intervenir en el desarrollo de resistencias antibióticas. También definieron 18 fragmentos de ADN específicos de

Map (MAP-1 a MAP-18), 16 de los cuales coincidían con los descritos previamente por Semret (Semret *et al.*, 2005).

Paralelamente, Paustian y colaboradores diseñaron un *microarray* basado en la secuencia de *Map* k10 (con más del 95% de los ORFs representados) y que por tanto podría determinar con precisión las regiones presentes en su genoma y ausentes en el ADN de las cepas analizadas (Paustian *et al.*, 2005). Al estudiar aislados de *M. avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* y *Map* tipo II (procedentes de distintas especies animales) observaron varias diferencias: por una parte, todas las cepas de *Map* presentaron un elevado grado de conservación genética, puesto que no se detectaron ORFs divergentes en ningún caso. El resto de especies presentaron grados de divergencia diversos, siendo *M. smegmatis* el más alejado (como era de esperar) y *M. avium* subsp. *silvaticum* el menos divergente: esto llevó a los autores a especular con la posibilidad de que esta última especie sea un eslabón intermedio entre *M. avium* y *Map*, ya que conserva fragmentos de ambas especies. Por último, observaron un gran polimorfismo de *Map* respecto al resto de especies concentrado en genes homólogos a la familia *mce* (*mammalian cell entry*) descritos en *M. tuberculosis* e implicados en la supervivencia intracelular (Arruda *et al.*, 1993), lo que sugiere que podrían estar implicados en la capacidad de esta bacteria para producir enfermedad (Paustian *et al.*, 2005).

Para tratar de esclarecer el grado de diversidad existente entre los tipos I y II de *Map* se analizó una cepa de tipo I en el *array* basado en *Map* k10 (Marsh *et al.*, 2006). El resultado fueron tres grandes regiones ausentes en la cepa de tipo I y presentes en k10, una de las cuales había sido descrita anteriormente como LSP^A20 (Semret *et al.*, 2006c), y otra que comprendía una delección descrita anteriormente mediante RDA (Marsh y Whittington, 2005). Estos tres LSPs representan el 0.6% del genoma de *Map* k10, y suman 29208 pb, siendo la mayor fuente de diversidad genética entre cepas de tipo I y II descrita hasta la fecha. Por desgracia, el hecho de que sólo el genoma de una cepa de tipo II estuviera secuenciado en su totalidad ha supuesto un gran inconveniente a la hora de determinar los posibles fragmentos presentes en las cepas S y no en las C. Sin embargo, con la reciente finalización de la secuenciación del primer genoma de una cepa de *Map* tipo I (Paustian *et al.*, 2007) este problema quedará resuelto, abriéndose un nuevo camino en el estudio de la diversidad genética del complejo *M. avium*.

Especie	ADNr 16S	ITS	<i>hsp65</i>	IS1245	IS1311	IS900	IS901	LSP ^A 8	LSP ^A 17	LSP ^A 20
<i>M. intracellulare</i>	9 SNPs (con <i>avium</i>)	MinA-D	Código 10-12, 14 hsp65.3-7, 9, hsp65.11-13	- (+)	-	-	-	¿?	¿?	¿?
<i>M. a. avium</i>	<i>avium</i>	Mav-A	Código 4 hsp65.1	+	+	-	+	+	-	+
<i>M. a. hominissuis</i>	<i>avium</i>	MavA-H	Códigos 1-3, 7-9, hsp65.1-2	+	+	-	-	+	-/+	+
<i>M. a. silvaticum</i>	<i>avium</i>	Mav-A	Código 4 hsp65.1	+	+	-	+	+	-	+
<i>Map</i>	tipo I	Mav-A	Código 6	-	+	+	-	-	+	-
	tipo II	Mav-A	Código 5 / hsp65.1	-	+	+	-	-	+	+
<i>M. chimaera</i>	1 SNP (con <i>M. intracellulare</i>)	MAC-A	Código 13 hsp65.9	-	¿?	-	-	¿?	¿?	¿?
<i>M. colombiense</i>	4 SNPs (con <i>avium</i>)	MAC-X	¿?	-/?	-/?	-	-	¿?	¿?	¿?

Tabla 2. Descripción de los genotipos descritos en las especies comprendidas en MAC: secuencias de los genes diana más utilizados y presencia/ausencia de algunas de los elementos de inserción y LSPs empleados con anterioridad para su identificación y caracterización.

+: presente; -: ausente; ¿?: sin determinar

OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Las micobacterias no tuberculosas y especialmente el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) están cobrando una importancia cada vez mayor en Sanidad Animal y también en Salud Pública. La paratuberculosis, causada por un miembro de este complejo (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*), es una enfermedad de gran importancia veterinaria presente en España en ganado vacuno, caprino y ovino. El impacto de esta enfermedad se deriva de su efecto directo sobre la productividad de los animales, por una parte, y de su posible acción sobre las técnicas para el diagnóstico de otra enfermedad causada por micobacterias, la tuberculosis. Otras especies del complejo *avium*, fundamentalmente *M. avium* subsp. *hominissuis*, son patógenos oportunistas del ser humano con una incidencia creciente, sujetas a un número de estudios cada vez mayor.

El objetivo global de esta tesis era determinar la importancia del complejo *M. avium* en aspectos que hasta ahora no habían sido tratados en profundidad en España. Así, los objetivos concretos que se pretendían abordar eran los siguientes:

1. Determinación de la prevalencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en fauna salvaje y peridoméstica en España, y de su potencial importancia en la epidemiología de la paratuberculosis.

2. Aplicación de técnicas de caracterización molecular en aislados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* presentes en el ganado doméstico en España.
3. Evaluación de la potencial interferencia de la paratuberculosis sobre la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico aplicadas para el control y erradicación de la tuberculosis bovina y caprina.
4. Aplicación de técnicas de caracterización molecular en el diagnóstico epidemiológico de infecciones por miembros del complejo *avium* en humanos, y evaluación de la diversidad molecular encontrada en *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Para poder cumplir con los objetivos marcados, la presente tesis doctoral queda dividida en cuatro capítulos, que integran los siguientes trabajos:

- CAPÍTULO I.
 - Julio Álvarez, Lucía de Juan, Víctor Briones, Beatriz Romero, Alicia Aranaz, Jose Francisco Fernández-Garayzábal y Ana Mateos. *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain (*Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* en gamo y jabalí en España). Artículo publicado en The Veterinary Record, 2005 (156, 212-213)
- CAPÍTULO II.
 - Lucía de Juan, Julio Álvarez, Alicia Aranaz, Antonio Rodríguez, Beatriz Romero, Javier Bezos, Ana Mateos, Lucas Domínguez. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle (Epidemiología molecular de aislados de tipos I/III de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* aislados de ganado caprino y vacuno). Artículo publicado en Veterinary Microbiology, 2006 (115, 102-110).
 - Julio Álvarez, Elena Castellanos, Lucía de Juan, Beatriz Romero, Javier Bezos, Sabrina Rodríguez, Alicia Aranaz, Ana Mateos, Lucas Domínguez. 2007. Characterization of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* isolates by Large Sequence Polymorphisms (LSP) detection and *hsp65* sequencing (Caracterización de aislados de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* mediante detección de polimorfismos de secuencia larga y secuenciación de *hsp65*). Trabajo presentado en el noveno coloquio

internacional de paratuberculosis organizado por la IAP (International Association for Paratuberculosis), 2007.

- CAPÍTULO III.

- Julio Álvarez, Lucía de Juan, Javier Bezos, Beatriz Romero, Jose Luis Sáez, F.J. Reviriego Gordejo, Víctor Briones, Miguel Ángel Moreno, Ana Mateos, Lucas Domínguez, Alicia Aranaz. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection (Interferencia de la paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis en un rebaño caprino con una doble infección natural). Artículo publicado en *Veterinary Microbiology*, 2008 (128, 72-80).
- Julio Álvarez, Lucía de Juan, Javier Bezos, Beatriz Romero, Jose Luis Sáez, Sergio Marqués, Concepción Domínguez, Olga Mínguez, Baudilio Fernández-Mardomingo, Ana Mateos, Lucas Domínguez, Alicia Aranaz. Effect of paratuberculosis in the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay (efecto de la paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en un rebaño con una doble infección mediante el uso de la prueba de detección de gamma-interferón). Artículo enviado para su publicación a *Veterinary Microbiology*.

- CAPÍTULO IV.

- Julio Álvarez, Ignacio Gómez García, Alicia Aranaz, Javier Bezos, Beatriz Romero, Lucía de Juan, Ana Mateos, Enrique Gómez-Mampaso, Lucas Domínguez. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from the environment: molecular characterization for diagnostic purposes (Diversidad genética en aislados de *Mycobacterium avium* procedentes de muestras clínicas y del ambiente: caracterización molecular con fines diagnósticos). Artículo publicado en *Journal of Clinical Microbiology*, 2008 (46, 1246-1251)

Además de los citados trabajos, los resultados obtenidos en el transcurso de la presente tesis doctoral han permitido la realización de dos estudios adicionales, que aún se encuentran en fase de redacción. El primero de ellos se integra en el capítulo 1, ya que estudia la prevalencia de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* y otras micobacterias en animales peridomésticos. El segundo se incluye en el trabajo realizado en el capítulo 4, y evalúa la diversidad genética encontrada en aislados de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

procedentes de hospedadores animales, humanos y del ambiente mediante diversas técnicas de caracterización molecular. En los resúmenes de los correspondientes capítulos se ofrece un esbozo de los resultados obtenidos, a la espera de finalizar la redacción de los mismos.

Capítulo I

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* EN ANIMALES DE VIDA SALVAJE Y PERIDOMÉSTICOS Y SU POTENCIAL IMPORTANCIA EN EL MANTENIMIENTO DE LA ENFERMEDAD

RESUMEN

La capacidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), agente causal de la paratuberculosis, para infectar distintas especies rumiantes ha quedado demostrada en numerosos estudios. Sin embargo, recientemente se ha ampliado el rango de potenciales hospedadores de este microorganismo, que ahora abarca también numerosas especies animales de vida salvaje (incluyendo monogástricos). Las repercusiones de este hallazgo pueden tener una gran trascendencia, ya que conlleva la posibilidad de que los animales salvajes o peridomésticos que entran en contacto de forma directa o indirecta con los rumiantes domésticos podrían introducir o mantener la infección en una explotación. La importancia epidemiológica de la fauna de vida libre en el ciclo de transmisión de *Map* quedó demostrada en Escocia, donde varios trabajos demostraron que el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) podía infectarse con cepas de ganado vacuno y actuar a su vez como fuente de infección para nuevos bóvidos.

Dada la ausencia de datos sobre la presencia de *Map* en fauna de vida libre en España [a excepción de un estudio en una población de gamos (*Dama dama*) en una reserva regional de caza en Asturias], se diseñó un estudio destinado a determinar la prevalencia de paratuberculosis en varias especies salvajes y peridomésticas en España. En el primer trabajo incluido en este capítulo se describen los resultados del análisis microbiológico realizado en muestras procedentes de 260 animales procedentes de zonas del sur de España, algunos de los

cuales provenían del Parque Nacional de Doñana. El muestreo incluyó especies de interés cinegético [ciervos (*Cervus elaphus*), gamo y jabalí (*Sus scrofa*)] que podían entrar en contacto con explotaciones circundantes de vacuno en régimen extensivo. En la observación de los animales y en el posterior análisis macroscópico de las muestras recogidas (linfonodos mesentéricos, válvula ileocecal y otras secciones de intestino) no se observaron en ningún caso lesiones compatibles con paratuberculosis. Sin embargo se obtuvieron dos cultivos positivos de *Map* (a partir de una muestra de jabalí y otra de gamo), ambos procedentes del Parque Nacional de Doñana y ambos pertenecientes al tipo II. Las bajas prevalencias observadas [1,54% en jabalíes, 0,04-8,28 para un intervalo de confianza (I.C.) de 95%; y 1,06% en gamos, 0,027-5,785, I.C. de 95%] parecen indicar que el patógeno se encuentra presente en ambas especies pero afectando a una baja proporción de individuos. La ausencia de lesiones macroscópicas parece indicar que los animales no sufrían un cuadro clínico; por otra parte, el aislamiento de *Map* a partir de muestras de tejido (no de heces) demuestra que ambos animales estaban infectados y no eran meros portadores. Las bajas tasas de infección observadas demuestran que la paratuberculosis no es una enfermedad importante en estas poblaciones, y que por tanto estas especies no juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la enfermedad en la zona (especialmente en comparación con rumiantes infectados que pueden liberar grandes cantidades de microorganismos al ambiente). Sin embargo la presencia de individuos infectados implica que podrían transportar la enfermedad a otras áreas teóricamente libres de la misma, lo que podría tener consecuencias dramáticas si no están contemplados como factores de riesgo en los planes de control de las explotaciones.

Los animales peridomésticos son otros hospedadores potenciales de *Map* que pueden entrar en contacto con los rumiantes domésticos, constituyendo por tanto un posible reservorio para los mismos. Por ello se también realizó un muestreo en distintas especies peridomésticas, incluyendo mamíferos (roedores fundamentalmente) y aves procedentes de áreas donde se encontraban explotaciones de caprino y vacuno con problemas de paratuberculosis. A pesar de que se analizaron mediante cultivo microbiológico más de 150 animales peridomésticos no se aisló *Map* a partir de ninguna de las muestras. Sin embargo se aislaron otras micobacterias, algunas de ellas pertenecientes al complejo *avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis* y *M. intracellulare*) y otras especies de micobacterias atípicas (*M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, y *M. interjectum* entre otras) que pueden ocasionar procesos patológicos en hospedadores humanos inmunodeprimidos. La tórtola (*Streptopelia turtur*) en las aves y la rata (*Rattus norvegicus*) en los mamíferos fueron las especies hospedadoras que presentaron mayores tasas de infección por micobacterias (trabajo en preparación).

ESTUDIO

SHORT COMMUNICATIONS

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain**

J. ÁLVAREZ, L. DE JUAN, V. BRIONES,
B. ROMERO, A. ARANAZ,
J. F. FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, A. MATEOS

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* is the aetiological agent of a chronic granulomatous enteritis in ruminants known as Johne's disease or paratuberculosis. It is considered to be one of the most serious diseases affecting dairy cattle worldwide, being responsible for significant economic losses (Harris and Barletta 2001). Its clinical relevance is commonly recognised in captive or farmed wild ruminants, but some studies have suggested that wild ruminant populations could also be an important natural reservoir of *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. The pathogen has already been isolated from a number of wild ruminant species, such as red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and tute elk (*Cervus elaphus nannodes*) (Cook and others 1997, Pavlik and others 2000). In Spain, there has been only one study of the presence of the pathogen in free-ranging fallow deer (Marco and others 2002). However, the host range of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* is not limited to ruminants, and it has also been isolated from a wide variety of wild non-ruminant species, such as fox (*Vulpes vulpes*), stoat (*Mustela erminea*), weasel (*Mustela nivalis*), crow (*Corvus corone*), rook (*Corvus frugilegus*), jackdaw (*Corvus monedula*), rat, wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), hare (*Lepus capensis*) and badger (*Meles meles*) (Beard and others 2001). There have been very few studies on the presence of the pathogen in wild boar (*Sus scrofa*), and none in Spain, despite the fact this species is known to be a relevant reservoir of another important and related pathogen, *Mycobacterium bovis* (Aranaz and others 2004). This short communication describes a study to investigate the presence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* in wild red deer, fallow deer and wild boar in the south and west of Spain.

A total of 260 animals (101 red deer, 94 fallow deer and 65 wild boar) was examined for the presence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* between 2001 and 2003. All animals had been hunted; no clinical signs of disease were observed and no gross lesions were detected at postmortem examination. Samples of intestine, ileocaecal valve and mesenteric lymph nodes were collected under aseptic conditions and kept refrigerated at 4°C until they were processed in the laboratory within eight hours. The tissue specimens from each animal were pooled and processed for *M. avium* subspecies *paratuberculosis* isolation as described by Greig and others (1999). Selective media (Middlebrook 7H11 agar, Herrold's egg yolk medium [HEYM], HEYM plus sodium pyruvate and Löwestein-Jensen medium) (Biomedics) supplemented with antimicrobials (Mycobacteria Selectatab; MAST Laboratories) and 2 mg/litre mycobactin J (Allied Monitor) were incubated aerobically at 37°C and checked monthly for up to six months for the presence of colonies compatible with *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. Identification of suspect colonies was confirmed by two PCR reactions, the first aimed at the *M. avium* subspecies *paratuberculosis*-specific insertion sequence IS900 (Millar and others 1995), and the second tar-

geting a novel DNA sequence present in *M. avium* subspecies *paratuberculosis* isolates but absent in other strains from the *M. avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex (Collins and others 2002).

M. avium subspecies *paratuberculosis* was isolated from one wild boar and one fallow deer from the same area. No positive cultures were obtained from the red deer. Both isolates belonged to the cattle type, which is the most common in Europe regardless of the animal source (Whittington and others 2000). The low frequency of detection obtained in the fallow deer (1.1 per cent) was similar to that reported in the north of Spain by Marco and others (2002), as well as in other areas of Europe such as the Czech Republic (Pavlik and others 2000) or Scotland (Fawcett and others 1995). This suggests that, unlike farmed animals, free-ranging wild cervid populations are rarely infected by the pathogen (Jessup and Williams 1999).

The present study is the first of wild boar carried out in Spain and the second one in Europe. Machackova and others (2003) investigated the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* in wild boar in several central European countries (Bosnia and Herzegovina, Croatia, the Czech Republic, Hungary and Slovakia). The detection frequency of the pathogen reported by those authors was even lower than that found in the present study (1.5 per cent with a confidence interval of 95 per cent). From these data, it seems likely that a low prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* infections in wild boar should also be expected.

Despite low frequencies of detection found in the three animal species under study, the epidemiological consequences should be considered with caution. It is well known that most infected dairy cows do not develop clinical signs despite shedding the pathogen in their faeces (Chiodini and others 1984). These infected animals represent a source of contamination of the environment, where the pathogen is able to persist for long periods of time (Larsen and others 1956), contributing to the infection of new hosts by the faecal-oral route (Chiodini and others 1984). A similar situation could also occur in wild deer and boar populations. Thus, the detection of deer and boar infected by *M. avium* subspecies *paratuberculosis* is still epidemiologically relevant, as these animals might contribute to the persistence and spread of the pathogen, particularly where higher densities of animals occur (such as at drinking points and in dens and shelters). In particular, wild boar should be given greater consideration, as they have the potential to spread the pathogen in a broader range due to their active behaviour, high mobility and increasing populations in some areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grants QLK2-CT-2001-00879 (EU) and AGL 2001-2029 (Spanish Ministry of Science and Technology). J. Á. is the recipient of a predoctoral grant assigned by the Spanish Ministry of Education and Culture.

References

- ARANAZ, A., DE JUAN, L., MONTERO, N., SÁNCHEZ, C., GÁLKA, M., DELSO, C., ÁLVAREZ, J., ROMERO, B., BEZOS, J., VELA, A. L., BRIONES, V., MATEOS, A. & DOMÍNGUEZ, L. (2004) Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2602-2608.
- BEARD, P. M., DANIELS, M. J., HENDERSON, D., PIRIE, A., RUDGE, K., BUXTON, D., RHIND, S., GREIG, A., HUTCHINGS, M. R., MCKENDRICK, L., STEVENSON, K. & SHARR, J. M. (2001) Paratuberculosis infection of non-ruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1517-1521.
- CHIODINI, R. J., VAN KRUNINGEN, H. J. & MERKAL, R. S. (1984) Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinarian* 74, 218-262.

Veterinary Record (2005)
156, 212-213

J. Álvarez, DVM,
L. de Juan, DVM,
V. Briones, DVM, PhD,
B. Romero, DVM,
A. Aranaz, DVM, PhD,
J. F. Fernández-
Garayzábal, DVM, PhD,
A. Mateos, DVM, PhD,
Departamento de Sanidad
Animal, Facultad de
Veterinaria, Universidad
Complutense de Madrid,
28040 Madrid, Spain

Correspondence to
Dr Briones

- COLLINS, D., DE ZOETE, M. & CAVAGNAC, S. M. (2002) *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4760-4762.
- COOK, W. E., CORNISH, T. E., SHIDLER, S., LASLEY, B. & COLLINS, M. T. (1997) Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 635-637.
- FAWCETT, A. R., GODDARD, P. J., MCKELVEY, W. A. C., BUXTON, D., REID, H. W., GREIG, A. & MACDONALD, A. J. (1995) Johne's disease in a herd of farmed red deer. *Veterinary Record* 138, 165-169.
- GREIG, A., STEVENSON, K., HENDERSON, D., PÉREZ, V., HUGHES, V., PAVLIK, I., HINES, M. E., II, MCKENDRICK, I. & SHARP, J. M. (1999) Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1746-1751.
- HARRIS, N. B. & BARLETTA, R. G. (2001) *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 489-512.
- JESSUP, D. A. & WILLIAMS, E. S. (1999) Paratuberculosis in free-ranging wildlife in North America. In *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy*, 4th edn. Eds M. E. Fowler, R. E. Miller. Philadelphia, W. B. Saunders. pp 616-620.
- LARSEN, A. B., MERKAL, R. S. & VARDAMAN, T. H. (1956) Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 17, 549-551.
- MACHACKOVA, M., MATLOVA, L., LAMKA, J., SMOLIK, J., MELICHAREK, I., HANZLIKOVÁ, M., DOCEKAL, J., CVETNIC, Z., NAGY, G., LIPIEC, M., OCEPEK, M. & PAVLIK, I. (2003) Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 and 2001. *Veterinární Medicina* 48, 51-65.
- MARCO, I., RUIZ, M., JUSTE, R., GARRIDO, J. M. & LAVIN, S. (2002) Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 38, 629-632.
- MILLAR, D. S., WITHEY, S. J., TIZARD, M. L., FORD, I. G. & HERMONTAYLOR, J. (1995) Solid-phase hybridization capture of low-abundance target DNA sequences: application to the polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum*. *Analytical Biochemistry* 226, 325-330.
- PAVLIK, I., BARTL, J., DVORSKA, L., SVASTOVA, P., DU MAINE, R., MACHACKOVA, M., YAYO AYELE, W. & HORVATHOVA, A. (2000) Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Veterinary Microbiology* 77, 231-251.
- WHITTINGTON, R. J., HOPE, A. E., MARSHALL, D. J., TARAGEL, C. A. & MARSH, I. (2000) Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: 18S rRNA restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3240-3248.

Capítulo II

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN
AISLADOS DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*
PRESENTES EN EL GANADO DOMÉSTICO EN ESPAÑA

RESUMEN

El agente causal de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), ha sido objeto de numerosos estudios de caracterización molecular aplicando diversas técnicas. En general se ha llegado a un consenso sobre la existencia de dos grupos fundamentales, las cepas de tipo I (u ovinas) y las de tipo II (o bovinas), describiéndose en algunos casos un tercer grupo (III o intermedio) situado entre ambas (si bien este tercer grupo queda encuadrado junto con el primero en algunos trabajos). La determinación del tipo de cepa de un aislado determinado tiene gran importancia, ya que los tres grupos se diferencian por sus características genotípicas y también por sus fenotipos. Las diferencias fenotípicas más relevantes descritas hasta la fecha incluyen la velocidad de crecimiento *in vitro*, la capacidad para ser aisladas en determinados medios de cultivo y una aparente preferencia de hospedador, al menos en ciertas localizaciones geográficas. En este sentido, las cepas de tipo I han sido aisladas fundamentalmente a partir de muestras de pequeños rumiantes, mientras que las de tipo II parecen capaces de colonizar un rango mucho mayor de hospedadores. La distribución de los distintos grupos también es muy desigual, ya que mientras que se ha notificado la presencia de aislados de tipo II en prácticamente todo el mundo, las cepas de tipo I han sido aisladas con una menor frecuencia, y los hallazgos de aislados de tipo III eran anecdóticos (en parte posiblemente debido a una incompleta caracterización de los aislados).

En este contexto se realizaron los dos trabajos incluidos en este capítulo, diseñados para determinar los tipos de cepa presentes en ganado doméstico en España, y hacer una estimación de las prevalencias de cada uno de ellos.

En el primero de ellos se aplicaron técnicas de caracterización molecular para el estudio de un panel de 158 aislados de *Map* procedentes de distintas localizaciones geográficas de España y de distintas especies (bovino, caprino y ovino). Dada la baja tasa de crecimiento *in vitro* propia de las cepas de los tipos I y III se utilizaron técnicas basadas en PCR, para las que se necesita una menor cantidad de ADN en comparación con otras pruebas (como PFGE o RFLP). Estas técnicas diferencian los aislados de tipo II de los de tipo I y III, pero no son capaces de discriminar entre los dos últimos, por lo que en los resultados ambos grupos se integran como tipo I/III. Los resultados revelan una proporción de aislados de tipo I/III inusualmente elevada (32.9%) teniendo en cuenta lo descrito en otros países europeos. Especialmente llamativo resulta el hallazgo de infecciones por cepas pertenecientes al tipo I/III en rebaños de ganado bovino; aunque se han descrito otros casos de aislamientos de cepas I/III en esta especie, normalmente se relacionaba con el contacto directo o indirecto con pequeños rumiantes infectados. Sin embargo en los rebaños descritos en este trabajo se sugería un mantenimiento de la infección en bovino sin la participación de otros hospedadores. En uno de los rebaños se detectó incluso una infección mixta por cepas de tipos I/III y II. Del mismo modo, es reseñable el hecho de que las cepas de tipo I/III fueron aisladas exclusivamente de razas de ganado bovino y caprino autóctonas, lo que podría indicar o bien una especial susceptibilidad de estas razas, o bien la existencia de endemismos circunscritos a las mismas, mientras que las cepas de tipo II circularían de forma más frecuente en el ganado importado.

Las diferencias a nivel genotípico entre ambos tipos de *Map* fueron objeto del segundo trabajo, centrado en la detección de polimorfismos de secuencia larga (LSPs) y en la determinación de la secuencia del gen *hsp65* en un panel de 22 aislados de *Map* de tipos II y III procedentes de distintas especies y áreas de España. A pesar de ser varios los estudios que habían estudiado estos fragmentos de ADN en *Map*, el perfil de los mismos en aislados de tipo III estaba aún por determinar. Los LSPs objeto del estudio se seleccionaron atendiendo a su capacidad para discriminar entre los tipos I y II, con el fin de establecer si los aislados de tipo III analizados presentaban un perfil específico o bien coincidían con alguno de los dos ya descritos. El patrón de presencia/ausencia de los LSPs seleccionados (LSP^A4-II, LSP^A18 y LSP^A20) y el *sequevar* del gen *hsp65* identificados en todos los aislados de tipo III incluidos en el panel coincidió totalmente con el previamente descrito para aislados de tipo I, lo que pone de

manifiesto la mayor similitud de las cepas pertenecientes al grupo III con el grupo I (como ya se había apuntado empleando otras técnicas moleculares) respecto al grupo II.

En conclusión, queda evidenciada la importante presencia de aislados pertenecientes a los tipos I/III en España, asociándose además en ocasiones a ganado vacuno (lo que resulta muy poco frecuente en otros países) y particularmente a razas autóctonas. Todo ello perfila un escenario epidemiológico muy diferente al descrito en otros países europeos, lo que puede tener ciertas implicaciones, ya que, por ejemplo, queda demostrada la conveniencia de incluir medios de cultivo capaces de permitir el crecimiento *in vitro* de los aislados de tipo I/III al realizar análisis microbiológicos en áreas donde se desconozca la naturaleza de la cepa causante de la enfermedad. Por otra parte, se pone de manifiesto la capacidad de las cepas de tipo I/III para infectar hospedadores bovinos y mantener la infección en esta especie en ausencia de pequeños rumiantes, lo que cuestionaría la existencia de preferencia de hospedador atribuidas a los distintos tipos, al menos en ciertas circunstancias. Por ello la costumbre de asociar las cepas de tipo II con el término “bovino” resultaría inadecuada, ya que en esta especie podríamos encontrar aislados de tipo I/III, por lo que se recomienda utilizar la terminología I, II y III en lugar de bovino, ovino e intermedia.

ESTUDIO 1

Available online at www.sciencedirect.com

Veterinary Microbiology 115 (2006) 102–110

**veterinary
microbiology**

www.elsevier.com/locate/vetmic

Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle

L. de Juan^a, J. Álvarez^a, A. Aranaz^{a,*}, A. Rodríguez^b, B. Romero^a,
J. Bezos^a, A. Mateos^a, L. Domínguez^a

^aDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,
Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^bDepartamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,
Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Received 2 November 2005; received in revised form 29 December 2005; accepted 5 January 2006

Abstract

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) isolates classifies them into three groups: cattle or Type II, sheep or Type I, and intermediate or Type III. To avoid problems associated with characterization of extremely slow growth strains, PCR-based techniques that divide the *M. a. paratuberculosis* strains in two main groups (cattle or Type II, and sheep or Types I/III) can be performed. The objectives of this study were to characterize the *M. a. paratuberculosis* isolates identified by different PCR-based tests (IS1311-PCR and restriction endonuclease analysis, PCR test based on a DNA sequence difference, and a PCR aimed at three Type I-specific loci), and to determine the clinical and epidemiological implications of Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains in livestock. One hundred and fifty-eight *M. a. paratuberculosis* strains from domestic ruminants were analyzed. One hundred and six *M. a. paratuberculosis* isolates (61 from goats and 45 from cattle) were classified as Type II strains; and 52 (29 from cows, 20 from goats, and three from sheep) were included in the Types I/III. The Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains were associated to Spanish native breeds. The majority of these animals had not been in direct or indirect contact with sheep flocks infected with *M. a. paratuberculosis*. This fact should be taken into account when implementing paratuberculosis control programs.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; Molecular; Epidemiology; Type I; Type II; Type III; Sheep; Goat; Cattle

1. Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the aetiological agent of Johne's disease or

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943721;

fax: +34 91 3943908.

E-mail address: alaranaz@vet.ucm.es (A. Aranaz).

paratuberculosis, a chronic enteritis that affects a wide range of hosts, mainly domestic ruminants (Chiodini et al., 1984) and causes serious economic problems (Kennedy and Benedictus, 2001). Moreover, the possible role of *M. a. paratuberculosis* in Crohn's disease is under study (Naser et al., 2004). Paratuberculosis is widespread in most countries and in some cases control programs are applied to reduce the prevalence of this infection (Groenendaal et al., 2003; Jubb and Galvin, 2004; Tharaldsen et al., 2003).

M. a. paratuberculosis strains have been classified into three groups (cattle, sheep and intermediate types) based on restriction fragment length polymorphism analysis coupled with hybridization to the insertion sequence IS900 (IS900-RFLP) and culture characteristics (Table 1). The cattle type, the most common in Europe, has been isolated primarily from cattle, and other domestic and wild ruminants, nonruminant species, and also humans (Pavlik et al., 1995, 1999). The sheep type strains are extremely slow growers and in this group are included: (i) pigmented and non-pigmented strains isolated from sheep in Morocco, Scotland, Iceland, South Africa, Australia and New Zealand (Collins et al., 1990; de Lisle et al., 1992; Bauerfeind et al., 1996; Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2000, 2001); (ii) strains isolated from cattle from Australia and Iceland (Whittington et al., 2001); (iii) strains isolated from goats from New Zealand (Collins et al., 1990). The intermediate group has been described in a few ovine isolates from South Africa, Canada and Iceland (Collins et al., 1990; de Lisle et al., 1992, 1993) as well as caprine isolates from Spain (de Juan et al., 2005).

A similar division of strains has been achieved by characterization by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (Stevenson et al., 2002; de Juan et al., 2005). PFGE allows the division of *M. a. paratuberculosis* isolates into three main groups: Types I, II and III, which would correspond with the sheep, cattle and intermediate groups, respectively (Table 1).

The major problem with the IS900-RFLP and PFGE analysis is the fact that a high quantity of high quality DNA is needed, and therefore these techniques are difficult to apply to extremely slow growth isolates (Types I and III strains). To avoid this problem, PCR-based techniques that divide the *M. a. paratuberculosis* strains in two main groups that would correspond with the cattle or Type II, and the sheep or Types I/III can be performed. This preliminary classification is possible by application of one of the following PCR-based tests: (i) IS1311-PCR and restriction endonuclease analysis with *Hinf*I (Marsh et al., 1999); in this case a subdivision of the cattle or Type II strains (Bison type) of *M. a. paratuberculosis* has also been described in bison, buffalo, cattle, goat and sheep (Whittington et al., 2001; Sevilla et al., 2005; Singh et al., 2005); (ii) DMC-PCR (Collins et al., 2002); (iii) a PCR aimed at three Type I-specific loci missing in Type II strains, RDA-PCR (Dohmann et al., 2003) (Table 1).

Nowadays, despite the scarcity of molecular characterization studies in different countries, the general assumption is that Types I/III (sheep) strains are most common in sheep from Iceland, Australia and New Zealand (Cousins et al., 2000; Whittington et al., 2001). In Spain, there are not exhaustive studies regarding the characterization of *M. a. paratuberculosis* strains infecting the livestock. Therefore, the objectives of this study were to

Table 1

Correspondence of the nomenclature used in the techniques for the molecular characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates

IS900-RFLP ^a	PFGE ^b	IS1311/PCR-REA ^c	DMC-PCR ^d	RDA-PCR ^e
Cattle	Type II	Cattle, Bison	Cattle	Type II
Sheep	Type I			
Intermediate	Type III	Sheep	Sheep	Type I

^a IS900-RFLP types as defined by Pavlik et al. (1999).

^b PFGE types as described by Stevenson et al. (2002) and de Juan et al. (2005).

^c IS1311/PCR-REA types as described by Marsh et al. (1999) and Whittington et al. (2001).

^d DMC-PCR types as defined by Collins et al. (2002).

^e RDA-PCR types as defined by Dohmann et al. (2003).

characterize the *M. a. paratuberculosis* isolates identified in Spain, and to determine the clinical and epidemiological implications of Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains in livestock.

2. Materials and methods

2.1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains

One hundred and fifty-eight *M. a. paratuberculosis* strains from domestic ruminants from different Spanish regions were analyzed (Table 2). The study included 74 *M. a. paratuberculosis* strains from 14 cattle herds, 81 from 23 goat flocks and three from two ovine flocks. *M. a. paratuberculosis* isolates were selected from different regions all over the country to represent the situation of Spanish farms.

These *M. a. paratuberculosis* isolates had been obtained from ileocecal valve and mesenteric lymph nodes ($n = 132$) and faeces ($n = 26$) as described previously (Greig et al., 1997). Briefly, each decontaminated pellet was resuspended in 0.5 ml of sterile distilled water and inoculated onto selective media [Middlebrook 7H11 agar, Herrold's egg yolk medium (HEYM) with and without sodium pyruvate and Löwenstein-Jensen] (Biomedics, Madrid, Spain) supplemented with Selectatabs (Code MS 24; MAST Laboratories Ltd. Merseyside, United Kingdom) and 2 µg/ml of mycobactin J (Allied Monitor, Fayette, MO). Tubes were incubated at 37 °C and checked for growth every 15 days. All suspected colonies were stained for acid–alcohol fastness by Ziehl-Neelsen and subcultured in HEYM without mycobactin to determine their mycobactin dependence. Bacterial growth was recovered from the tubes, suspended in sterile purified water, heat inactivated, and subjected to a PCR analysis for IS900 (Kunze et al., 1992; Millar et al., 1995) and f57 (Poupart et al., 1993) for identification.

2.2. Classification of *M. a. paratuberculosis* strains in Type II (cattle) and Types I/III (sheep) by PCR tests

IS1311-PCR and restriction endonuclease analysis with *Hinf*I, and the DMC-PCR to discriminate

between Type II (cattle) and Types I/III (sheep) *M. a. paratuberculosis* strains were performed as described previously by Marsh et al. (1999) and Collins et al. (2002), respectively. The specific PCRs for the RDA fragments (pig-RDA10, pig-RDA20 and pig-RDA30) specific for *M. a. paratuberculosis* Type I isolates were carried out as described by Dohmann et al. (2003) using a slightly modified protocol. We used a combination of the original primers from the paper (p20, p21 and p23) and three new ones (oMP63a: 5'-TGT GCG AGC GCG AAA ACC GC-3'; oMP66b: 5'-TGC GAA GCC GAG ACC CGA AG-3', and oMP72c: 5'-TGA TCA GCT CCA GGA TCG CGC-3') (K. Dohmann, personal communication). The expected size of the PCR products is 382 (pig-RDA10: oMP63a and p20), 560 (pig-RDA20: p21 and oMP66b) and 525 base pairs (pig-RDA30: p23 and oMP72c).

3. Results

3.1. Classification of *M. a. paratuberculosis* strains in Type II (cattle) and Types I/III (sheep) by PCR tests

The 158 *M. a. paratuberculosis* isolates were classified into Type II and Types I/III strains depending on the results obtained by IS1311/PCR-REA (Fig. 1A), DMC-PCR (Fig. 1B) and RDA-PCR (Fig. 1C). One hundred and six *M. a. paratuberculosis* isolates [61 (75.3%) from goats and 45 (60.8%) from cattle] out of the 158 isolates (67.1%) were classified as Type II strains; and 52 [29 (39.2%) from cows, 20 (24.7%) from goats, and three (100%) from sheep] out of the 158 strains (32.9%) were included in the Types I/III *M. a. paratuberculosis*. The distribution of Type II (cattle) and Types I/III (sheep) *M. a. paratuberculosis* strains is summarized in Table 3.

The majority of cattle farms were infected with Type II *M. a. paratuberculosis* strains (92.9%), although in two farms (CA and CB) Types I/III were identified. Moreover, the farm CB had both types of *M. a. paratuberculosis* strains. Regarding goat flocks, 39.1% of the farms were infected with Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains. In the two sheep flocks analyzed in this study, Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains were identified.

Table 2
Geographical distribution of *M. a. paratuberculosis* isolates ($n = 158$) included in the study

Animal species	Origin	Farm	Breed	Type II	Types I/III
Cattle ($n = 74$)	Castilla-La Mancha (central-south Spain)	CA	Bullfighting	–	19
		CB	Bullfighting	22	10
	Castilla y León (central-north Spain)	CC	Morucha	1	–
		CN	Limousine	1	–
		CD	Holstein	1	–
	Asturias (north Spain)	CE	Unknown	1	–
		CF	Holstein	1	–
	Madrid (central Spain)	CG	Unknown	1	–
		CH	Holstein	3	–
		CI	Holstein	1	–
		CJ	Holstein	1	–
	Cantabria (north Spain)	CK	Unknown	1	–
		CL	Holstein	7	–
	Balearic islands	CM	Holstein	4	–
Goat ($n = 81$)	Castilla-La Mancha (central-south Spain)	GA	Murciano-Granadina	2	–
		GB		1	–
		GU		2	–
		GW		–	4
		GX		22	–
	Madrid (central Spain)	GC	Guadarrama	1	–
		GD		2	–
		GE		3	–
		GF		–	1
		GG		–	4
		GH		2	–
		GI		1	–
		GJ		1	–
		GK		–	1
		GL		1	–
		GM		–	2
		GN		21	–
		GO		–	1
		GP		–	4
		GQ		–	2
		GR		1	–
		GS		–	1
		GT		1	–
Sheep ($n = 3$)	Castilla-La Mancha (central-south Spain)	SA	Unknown	–	2
	Castilla y León (central-north Spain)	SB	Unknown	–	1

The code of the farms has been assigned as a C, G, or S for a cattle herd, goat flock or sheep flock, respectively. Letters have been added in correlative order.

3.2. Characteristics of *M. a. paratuberculosis* strains belonging to the Types I/III

All the Types I/III strains from cattle and goats were isolated from Spanish native breeds, in the case of goats from the Guadarrama and Murciano-Granadina breed and in cattle from bullfighting breed (Table 2). The cattle farms with Types I/III strains are characterized by

a singular extensive management system. No data regarding the breed of the sheep isolates is available. The infection with Types I/III is widespread in Spain. The farms with this type ($n = 13$) are located in Castilla-La Mancha (central-south Spain), Castilla y León (central-north Spain) and Madrid (central Spain).

All the Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains were isolated from tissue samples (ileocecval valve,

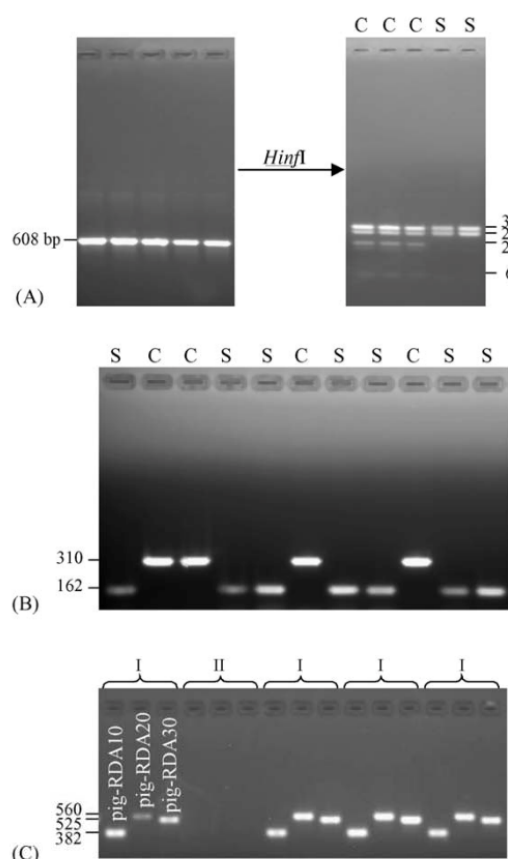


Fig. 1. Strain characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates. C: cattle group; S: sheep group; I: Type I; II: Type II. (A) IS1311/PCR-REA performed following the protocol of Marsh et al. (1999). The 608-bp band indicates the presence of the IS1311. The restriction of the PCR product with *HinfI* classifies *M. a. paratuberculosis* isolates into two types depending on the sizes band: cattle type (323, 285, 218 and 67) and sheep type (323 and 285); (B) DMC-PCR performed following the protocol of Collins et al. (2002). The 310-bp band corresponds with cattle type and the 162-bp band with sheep type; (C) Type I-specific loci PCRs performed following the protocol of Dohmann et al. (2003). Isolates from the Type I give a positive result to the pig-RDA10 (382-bp), pig-RDA20 (560-bp) and pig-RDA30 (525-bp) PCRs. Type II isolates are negative to the three PCRs.

intestine and mesenteric lymph node). In the farms CA and GW where Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains had been isolated, faeces samples were also processed and in all the cases a negative result by culture was obtained. However, the *M. a. paratuberculosis* strains isolated from animals from eight farms

Table 3

Number of farms (percentage) infected with Type II and I/III *M. a. paratuberculosis* strains

Animal species	N farms	Type II ^a	Types I/III ^a	Types II and I/III ^a
Cattle	14	12 (85.7)	1 (7.15)	1 (7.15)
Goat	23	14 (60.9)	9 (39.1) ^b	–
Sheep	2	0	2 (100)	–

^a Characterization of the isolates based on IS1311/PCR-REA (Marsh et al., 1999), DMC-PCR (Collins et al., 2002), and RDA-PCR (Dohmann et al., 2003).

^b Lack of growth of these isolates made impossible characterization by PFGE. Five isolates from two goat flocks that yielded enough growth showed Type III pattern.

where faeces were processed (CF, CH, CI, CJ, CM, CN, GA and GX) were of the Type II.

M. a. paratuberculosis strains belonging to the Types I/III were characterized by an extremely slow growth rate (Fig. 2). Twenty-six out of the 52 Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains (50%) took 5 or more months to grow. However, most of the Type II *M. a. paratuberculosis* strains grew between 1 and 3 months (data not shown).

4. Discussion

The nomenclature of molecular characterized *M. a. paratuberculosis* groups of strains is confusing and complex since it depends on the molecular technique applied. The nomenclature of Types I, II and III for molecular characterization by PFGE (Stevenson et al.,

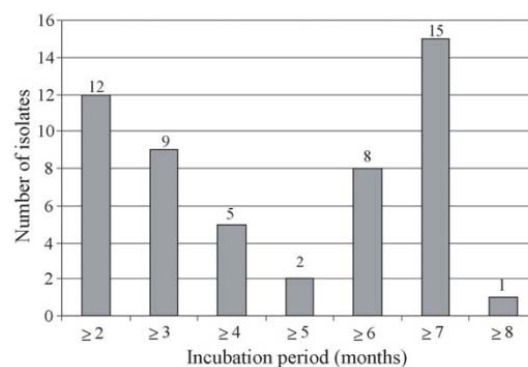


Fig. 2. Incubation period of the 52 *M. a. paratuberculosis* Types I/III strains obtained in this study (cattle $n = 29$, goat $n = 20$ and sheep $n = 3$).

2002; de Juan et al., 2005) has been proposed since there is no direct relation with the host. However, problems arise when working with extremely slow growing *M. a. paratuberculosis* strains, and the characterization by PFGE and IS900-RFLP is not achievable. In these cases, it is impossible to establish a direct correlation between PCR-based tests (sheep and cattle) and PFGE results (Types I, II and III). Since PCR-based tests classify *M. a. paratuberculosis* in two main groups, and these isolates have genetic and phenotypic characteristics, which are easily distinguishable, we propose the name of Types I/III and II. PCR-based tests do not differentiate between Types I and III, showing the need of the development of techniques based on PCR as discriminative as IS900-RFLP and PFGE.

In our study, from the 52 Types I/III isolates we have been able to obtain sufficient growth to develop the PFGE and IS900-RFLP techniques in only five *M. a. paratuberculosis* strains isolated from goats (three from farm GC and two from farm GQ). Each farm had a different profile but all of them belonged to the Type III or intermediate group by PFGE and IS900-RFLP, respectively (data not shown). These five goat isolates were also positive to the RDA-PCRs (Dohmann et al., 2003) revealing that these three loci are not only specific to Type I strains but are also present in Type III strains. Thus these results support that strains belonging to the Type III are more similar to those of Type I than those of Type II when analyzed by molecular techniques and growth characteristics.

In this study, application of the PCR tests for general characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates allowed us to find a relatively high prevalence of Types I/III strains, mainly associated with Spanish native cattle and caprine breeds. To date, cattle and goats infected with *M. a. paratuberculosis* strains from Types I/III (sheep) in other countries have been reported only in five cattle from Scotland, Australia and Iceland (Watt, 1954; Whittington et al., 2001) and four goats from New Zealand (Collins et al., 1990). When comparing the published data with the number of Types I/III strains identified in our study (29 from cattle and 20 from goats), we can conclude that the prevalence in Spain of this type of *M. a. paratuberculosis* strains in cattle and goats is relatively high so far. Moreover, our findings would suggest that infection of cattle with *M. a. paratuberculosis* Types I/III strains is not occasional. In the CB farm, 10 out of the 32 *M. a. paratuberculosis*

isolates belonged to the Types I/III strains, and in the CA farm Types I/III strains were identified in 19 animals. In the authors' knowledge, this is the first description in a cattle herd of a mixed infection with Types II and I/III strains. No mixed infection in a single animal has been observed, although it could not be ruled out due to the overgrowth of Type II strains over the Types I/III strains.

An epidemiological study was carried out in Australia and Iceland where Types I/III (sheep) strains have been identified in cattle (Whittington et al., 2001). In each bovine case there had been a direct contact by grazing in the same pasture or indirect contact with paratuberculous sheep across a farm boundary fence. However in this study, none of the two cattle extensive management herds (CA and CB) of bullfighting breed where Types I/III strains were identified had direct contact with sheep or goat flocks. In the farm CB, a native sheep flock is reared in the same property although pasture areas and facilities are distant from the areas inhabited by the cattle herd. To our knowledge, the only presumed natural case of paratuberculosis in cattle with Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains was described by Watt (1954) in one cow in Scotland infected with a pigmented strain, although complete characterization of the isolate is not available. Interestingly, most of the Type II *M. a. paratuberculosis* strains isolated in this study were isolated from imported dairy or meat cattle breeds, whereas the Types I/III strains were isolated from bullfighting autochthonous breed. Even more, in the farm CB where the two types of strains have been isolated, the bullfighting cattle shares the pastures with a group of Holstein cattle. Regarding the eight goat farms where Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains have been identified five of them were in contact with sheep (GF, GG, GM, GP and GQ). However, the sheep did not show any sign of infection at the time of the beginning of the study (1999) and since then no clinical signs have been observed in the sheep flocks (data provided by veterinarians); though definitive laboratory information is not available. Therefore, our result would indicate that direct or indirect contact with sheep is not the only factor to identify cattle or goats with Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains in Spain.

The isolation of Types I/III strains only in native Spanish breeds (bullfighting, Guadarrama and Murciano-Granadina) is intriguing. Our findings open a new

research line regarding susceptibility of certain breeds to infection with type of *M. a. paratuberculosis* strains. Another possibility would be the case of historic infection (breeds infected with Types I/III strains for a long period of time) as occurs with tuberculosis in Spanish goats with *M. caprae* (Aranaz et al., 1999). Both bullfighting herds had been raised for a long time following a closed system. Nevertheless further studies are needed to corroborate our findings.

Differences in the macroscopical lesions found in the post-mortem examinations prompted us to get an insight into the histological features. Our preliminary pathological findings in goats suggest that diffuse multibacillary granulomatous lesions [classified as described by Corpa et al. (2000)] are predominantly associated with Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains (Fig. 3A and B). Nevertheless in goats infected with Type II strains, a moderate to severe diffuse

lymphocytic infiltration with presence of numerous macrophages was observed (Fig. 3C). In this case, very low bacterial load in a Ziehl-Neelsen staining were appreciated in the macrophage cytoplasm (Fig. 3D). Further studies are being performed to accurately establish a likely relationship. Corroboration of this finding may have an outstanding impact on clinical and epidemiological consequences.

In summary, the prevalence and geographical spread of Types I/III strains in Spain is higher than previously expected. The description of Types I/III strains in cattle without contact with sheep opens a research line into determining the real consequences of these findings and the geographical and animal species distribution of the infection. We encourage laboratories to perform PCR-based tests to characterize their isolates as part of their diagnosis routine practices, as well as to develop PCR techniques to characterize *M. a. paratuberculosis*

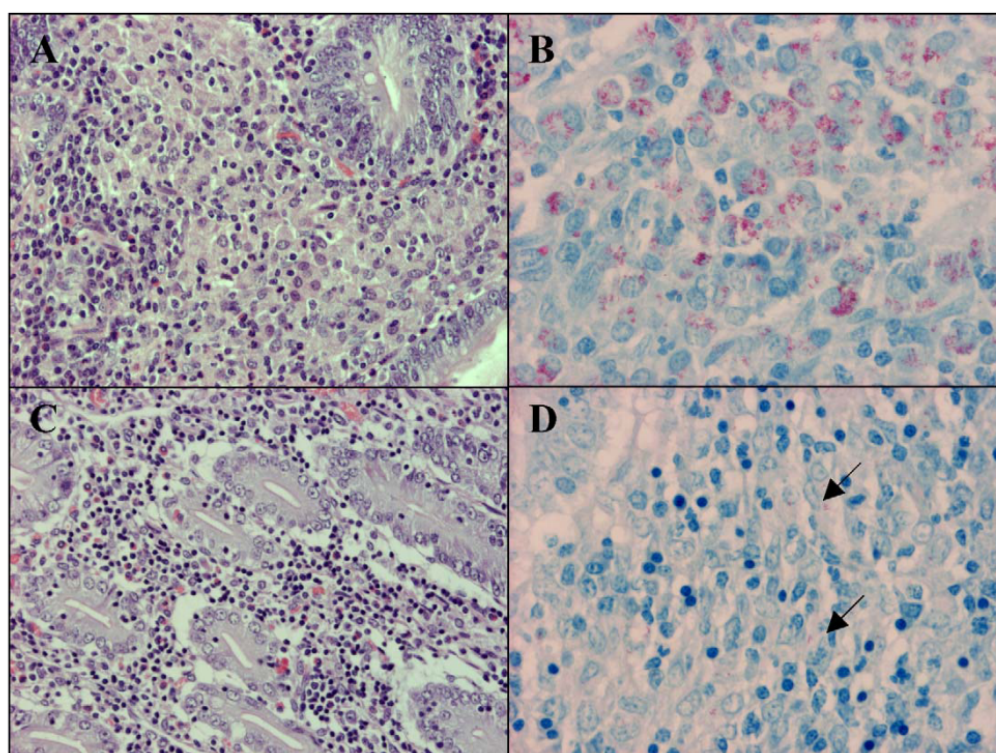


Fig. 3. Diffuse multibacillary granulomatous lesions induced by Types I/III *M. a. paratuberculosis* strains: (A) H&E 20 \times ; (B) with Ziehl-Neelsen technique, numerous pink-bacilli were observed in the cytoplasm of macrophages 40 \times . Severe lymphocytic infiltration with presence of disperse macrophages among glandular crypts in goats infected with Type II *M. a. paratuberculosis* strains: (C) H&E 20 \times ; (D) scarce number of pink-bacilli (arrows) with Ziehl-Neelsen staining 40 \times .

isolates for epidemiological studies. Molecular data regarding characterization of *M. a. paratuberculosis* isolates for exhaustive epidemiological studies regarding the origin and transmission of the disease is needed. This information must be incorporated in all countries when implementing control programs at herd/flock or national level.

Acknowledgements

This work was funded by the European Commission (QLRT-2000-01420) and by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA). We thank the collaboration of the Dirección General de Sanidad Agropecuaria, Consejería de Agricultura y Ganadería (Junta de Castilla y León), and the Dirección General de Agricultura, Consejería de Economía e Innovación Tecnológica (Comunidad de Madrid). We are grateful to P. Díez de Tejada, J.M. Fernández, and A. Santos for samples and excellent collaboration. We are grateful to Matthew Gilmour for careful revision of the manuscript.

References

- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1263–1273.
- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H., Baljer, G., 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1617–1621.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218–262.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
- Collins, D.M., De Zoete, M., Cavaignac, S.M., 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4760–4762.
- Corpa, J.M., Garrido, J., García Marín, J.F., Pérez, V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255–265.
- Cousins, D., Williams, S.N., Hope, A., Eamens, G.J., 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.* 78, 184–190.
- de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249–257.
- de Lisle, G.W., Collins, D.M., Huchzermeyer, H.F., 1992. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 59, 163–165.
- de Lisle, G.W., Yates, G.F., Collins, D.M., 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 567–571.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Strattmann, J., Kapur, V., Bull, T.J., Gerlach, G.F., 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5215–5223.
- Greig, A., Stevenson, K., Pérez, V., Pirie, A.A., Grant, J.M., Sharp, J.M., 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140, 141–143.
- Groenendaal, H., Nielen, M., Hesselink, J.W., 2003. Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. *Prev. Vet. Med.* 60, 69–90.
- Jubb, T.F., Galvin, J.W., 2004. Effect of a test and control program for Johne's disease in Victorian beef herds 1992–2002. *Aust. Vet. J.* 82, 164–166.
- Kennedy, D.J., Benedictus, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20, 151–179.
- Kunze, Z.M., Portaels, F., McFadden, J.J., 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2366–2372.
- Marsh, I., Whittington, R., Cousins, D., 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell Probes* 13, 115–126.
- Millar, D.S., Withey, S.J., Tizard, M.L., Ford, J.G., Hermon-Taylor, J., 1995. Solid-phase hybridization capture of low-abundance target DNA sequences: application to the polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Anal. Biochem.* 226, 325–330.
- Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364, 1039–1044.
- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., Koskova, S., 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45, 311–318.
- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I., 1999. Standardisation of restriction

- fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Meth. 38, 155–167.
- Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C., 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 31, 1601–1605.
- Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Adúriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H., Juste, R.A., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. In: Nielsen, S.S. (Ed.), Book of Abstracts and Scientific Program of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Inc., p. 88.
- Singh, S.V., Sharma, G., Yadav, D., Singh, A.V., Sevilla, I., Juste, R.A., Gupta, V.K., 2005. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Bison type) in cattle and buffalo population of Agra region in India. In: Nielsen, S.S. (Ed.), Book of Abstracts and Scientific Program of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. p. 143.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40, 1798–1804.
- Tharaldsen, J., Djonne, B., Fredriksen, B., Nyberg, O., Sigurdardottir, O., 2003. The National Paratuberculosis Program in Norway. Acta Vet. Scand. 44, 243–246.
- Watt, J.A.A., 1954. Johne's disease in a bovine associated with the pigmented strain of *Mycobacterium johnei*. Vet. Rec. 66, 387.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. J. Clin. Microbiol. 38, 3240–3248.
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Fridriksdottir, V., 2001. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. Vet. Microbiol. 79, 311–322.

ESTUDIO 2

Proceedings of 9ICP - 2007

Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by Large Sequence Polymorphisms (LSP) detection and *hsp65* sequencing

Alvarez J, Castellanos E, de Juan L, Romero B, Bezos J,
Rodriguez S, Aranaz A, Mateos A, Dominguez L

Animal Health Department, Laboratorio VISAVET, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid (Spain).

INTRODUCTION

Paratuberculosis or Johne's disease, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), affects ruminant and non-ruminant species, and causes reduced production, higher susceptibility to acquire other diseases and infertility (Kennedy & Benedictus, 2001). In Spain there are no official data regarding the prevalence of paratuberculosis, but the studies performed so far indicate it is present in all domestic ruminant species with variable prevalences (de Juan et al., 2006, Reviriego et al., 2000).

The complete genomes of two members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC), *Map* strain k10 and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strain 104, have been recently sequenced (Li et al., 2005). Comparison between these two genomes of closely related bacteria has revealed that, in spite of the identity between both genomes (over 97%) at the nucleotide level (Bannantine et al., 2003), there are large fragments of DNA present in one but not in the other, called Large Sequence Polymorphisms (LSP) that might be responsible of their divergent phenotypes (Semret et al., 2004, Wu et al., 2006).

Some of those LSPs are characteristic of bacterial subspecies within MAC, and can be used as diagnostic targets to correctly identify an isolate. Besides, some other LSPs can be used to distinguish between different types within one particular subspecies. In particular, three of those LSPs have been shown to distinguish *Map* isolates belonging to Types I and II: LSPa4-II, LSPa18 and LSPa20 (Semret et al., 2006). However, the LSP-profile of the Type III isolates of *Map* has not been determined yet.

In the present study a selection of Spanish *Map* isolates recovered from goats and cattle from different geographic areas were selected, in order to determine the LSPs profile of the these strains, particularly of the Type III isolates.

MATERIAL AND METHODS

Isolates were selected based on their host species, geographical origin and type of strain. The type of the isolates was determined using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR-REA analysis aimed to the IS1311 element (Marsh et al., 1999). Most of the isolates belonged to Type III; however, some strains previously characterized as Type II recovered from cattle and goats were also included in the panel as controls (Table 1).

All these isolates were analyzed using three-primer PCRs in order to demonstrate the presence/absence of LSPa4-II, LSPa20 and LSPa18. Primers and PCR conditions were performed according to Semret et al. (2006).

All isolates were further characterized by sequencing of the 65-kDa heat-shock protein gene (*hsp65*) according to Turenne et al. (2006).

RESULTS

Based on the PCR results, all Type III isolates presented the LSPa4-II and the LSPa18 in their genomes, but did not harbor the LSPa20. Moreover, all of them also contained the same sequevar for the *hsp65*, code 6 (Table 1).

On the other hand, and as could be anticipated, the analyzed Type II Spanish *Map* strains yielded the expected results in the PCRs for the LSPs and contained the code 6 *hsp65* sequevar, the one found in all Type II strains worldwide.

Table 1. PCR results of all *Map* strains analyzed

Host species	Map Type	LSPa4-II	LSPa18	LSPa20	<i>hsp65</i>
Cattle	II	-	-	+	Code 5
Cattle	II	-	-	+	Code 5
Cattle	II	-	-	+	Code 5
Cattle	II	-	-	+	Code 5
Cattle	II	-	-	+	Code 5
Goat	II	-	-	+	Code 5
Goat	II	-	-	+	Code 5
Goat	II	-	-	+	Code 5
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Cattle	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6
Goat	III	+	+	-	Code 6

DISCUSSION

LSPs are major genetic events that can be sources of the genetic variability found within MAC. These LSPs could be responsible, at least in part, of the different phenotypes that the MAC species can adopt, from widespread environmental mycobacteria (*M. avium* subsp. *hominissuis*) to obligate pathogens (*Map*).

Among *Map* strains, three types have been also described based on phenotypic and genotypic differences. The presence or absence of a panel of LSPs was evaluated in Type I and II strains, and some important differences were observed that could account for phenotypic divergence (Semret et al., 2006). In the present study, we analyzed a panel of Spanish strains, including Type III isolates, not examined before for the presence of LSPs.

All the Spanish Type II isolates showed the same *hsp65* sequence and LSP pattern that were previously described in isolates from different countries of Europe, America and Oceania (Semret et al., 2006), therefore confirming the homogeneity of this cluster regardless of the host species or the growth rate.

Regarding the Type III isolates, we found that all showed the same LSP-profile and *hsp65* sequence than those described for Type I strains, thus indicating a close relatedness between these two types. These findings may indicate that Type I and Type III strains have followed similar evolution processes. However, more studies are needed to detect if other LSPs can discriminate between these 2 types. Moreover, we have demonstrated that all Type III strains showed the same LSP profile, thus confirming this type is able to infect both goat and cattle.

ACKNOWLEDGEMENTS

Julio Álvarez was the recipient of a predoctoral grant assigned by the Spanish Ministry of Education and Culture, and performed a training stay in the laboratory of Dr. Marcel Behr (McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada).

We are grateful to M. Behr, C. Turenne and D. Alexander for their valuable lessons and encouragement.

Proceedings of 9ICP - 2007

REFERENCES

- Bannantine JP, Zhang Q, Li LL, Kapur V, 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. BMC Microbiol, 3, 10.
- de Juan L, Alvarez J, Aranaz A, Rodriguez A, Romero B, Bezos J, Mateos A, Dominguez L, 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. Vet Microbiol, 115, 102-110.
- Kennedy DJ, Benedictus G, 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 20, 151-179.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V, 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 102, 12344-12349.
- Marsh I, Whittington R, Cousins D, 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol Cell Probes, 13, 115-126.
- Reviriego FJ, Moreno MA, Dominguez L, 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. Prev Vet Med, 43, 43-51.
- Semret M, Turenne CY, de Haas P, Collins DM, Behr MA, 2006. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. J Clin Microbiol, 44, 881-887.
- Semret M, Zhai G, Mostowy S, Cleto C, Alexander D, Cangelosi G, Cousins D, Collins DM, van Soolingen D, Behr MA, 2004. Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. J Bacteriol, 186, 6332-6334.
- Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA, 2006. Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. J Clin Microbiol, 44, 433-440.
- Wu CW, Glasner J, Collins M, Naser S, Talaat AM, 2006. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. J Bacteriol, 188, 711-723.

Capítulo III

INTERFERENCIA DIAGNÓSTICA PROVOCADA POR LA PARATUBERCULOSIS
EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE RUTINA DE TUBERCULOSIS EN
GANADO VACUNO Y CAPRINO.

RESUMEN

En los países en los que la tuberculosis no ha sido erradicada en los rumiantes domésticos, la prioridad debe ser la detección del mayor número posible de animales infectados con el fin de acelerar el proceso de eliminación de la enfermedad. Esto se traduce en una utilización de las herramientas diagnósticas encaminada a la obtención de la mayor sensibilidad posible. Las pruebas más utilizadas para detectar la tuberculosis en las especies de abasto son la intradermotuberculinización (simple o comparada) y el test de detección del Interferón-gamma (IFN- γ).

La paratuberculosis, enfermedad presente en muchos países del mundo, ha sido estudiada como posible inductora de la aparición de falsos positivos a los test diagnósticos de tuberculosis en varios estudios, debido a la similitud antigénica de su agente causal, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), con los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo, su potencial efecto sobre la sensibilidad de las pruebas diagnósticas de tuberculosis, de mayor trascendencia en países que no han alcanzado el estado de libres de ésta enfermedad, no había sido evaluado en condiciones de campo.

En el presente capítulo se incluyen dos estudios encaminados a determinar el impacto de la presencia de la paratuberculosis en rebaños donde la tuberculosis está presente. En el

primer trabajo, realizado en un rebaño de cabras de Guadarrama con ambas infecciones, se evaluó la sensibilidad de la intradermotuberculinización simple, comparada y la prueba de detección de IFN- γ en 177 animales que fueron sacrificados después de la realización de las pruebas. Todos ellos fueron muestreados para el cultivo microbiológico de *M. caprae* (agente causal de la tuberculosis en este rebaño) y *Map*. El resultado de cultivo fue considerado la referencia a la hora de definir a los animales como infectados por cada uno de los patógenos.

La sensibilidad observada en el conjunto del rebaño en todas las pruebas empleadas fue menor que la descrita en otros trabajos en rebaños de cabras con tuberculosis. La prueba más afectada fue sin duda la intradermotuberculinización comparada, con una sensibilidad de 42,7%. La intradermotuberculinización simple y el test de IFN- γ identificaron la misma proporción de individuos infectados (un 71%), si bien detectaron subpoblaciones diferentes de animales positivos, poniendo de manifiesto la complementariedad de ambas pruebas. La influencia de la paratuberculosis en la detección de animales tuberculosos quedó patente al comparar la sensibilidad de las pruebas en los animales con una doble infección (tuberculosis y paratuberculosis) con la observada en todos los animales con tuberculosis: la proporción de animales detectados mediante los test cutáneos fue significativamente menor en los animales con una infección mixta, reafirmando la hipótesis de que la paratuberculosis estaba causando la baja sensibilidad observada en el conjunto del rebaño. El test de IFN- γ , sin embargo, pareció afectado en menor medida.

En el segundo trabajo se abordó el mismo problema en un rebaño de ganado de lidia. En este caso se evaluó la sensibilidad aparente obtenida mediante la aplicación del test de IFN- γ , por ser esta prueba la menos subjetiva en su interpretación. Al igual que en el caso anterior, todos los animales incluidos en el estudio (n=218) fueron analizados antes de su sacrificio, y posteriormente fueron muestreados para el cultivo microbiológico de *M. bovis* y *Map*, siendo el resultado de este cultivo el referente para definir el estatus de infección de cada animal. De nuevo la sensibilidad observada en el grupo de animales con una doble infección (50%) fue menor que la encontrada en los animales infectados solo por *M. bovis* (93,3%) o en el conjunto del rebaño (78,3%). Curiosamente, y de forma similar, la sensibilidad de un ELISA de detección de anticuerpos frente a *Map* fue estimada con parecidos resultados: la tasa de animales detectados fue menor en aquellos con una doble infección (50%) en comparación con la observada en los animales solo con paratuberculosis (79,8%). Estos datos ponen de manifiesto la interacción existente entre la respuesta inmune frente a ambas enfermedades, ya que nuestros resultados indican que la presencia de una afecta al diagnóstico de la otra. En este sentido, una

observación cuidadosa de los resultados de la prueba de IFN- γ y del ELISA frente a *Map* en los animales con una doble infección (n=16) reveló otro dato de interés: de los 8 animales positivos al test de IFN- γ , 6 (75%) fueron negativos al ELISA frente a *Map*; de forma opuesta, de los 8 individuos positivos en dicho ELISA, 6 (75%) fueron negativos en el test de IFN- γ .

Por todo lo anterior, queda de manifiesto el efecto negativo de la paratuberculosis en la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico de tuberculosis en rebaños de bovino y caprino con una doble infección. Resulta por ello fundamental determinar el estado sanitario de un rebaño en lo referente a paratuberculosis antes de aplicar y interpretar las pruebas diagnósticas de tuberculosis, no solo por su impacto en la especificidad, sino también por su efecto sobre la sensibilidad de las mismas.

ESTUDIO 1



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Veterinary Microbiology 128 (2008) 72–80

**veterinary
microbiology**

www.elsevier.com/locate/vetmic

Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection

Julio Álvarez^a, Lucía de Juan^a, Javier Bezos^a, Beatriz Romero^a, Jose Luis Sáez^b,
F.J. Reviriego Gordejo^c, Víctor Briones^a, Miguel Ángel Moreno^a,
Ana Mateos^a, Lucas Domínguez^a, Alicia Aranaz^{a,*}

^a *Laboratorio Visavet, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

^b *Subdirección General de Sanidad Animal, Dirección General de Ganadería,
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28071 Madrid, Spain*

^c *European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General,
Zootechnics, Froissart, 101 1040 Brussels, Belgium*

Received 6 July 2007; received in revised form 14 August 2007; accepted 17 August 2007

Abstract

Detection of infected animals is a key step in eradication programs of tuberculosis. Paratuberculosis infection has been demonstrated to compromise the specificity of the diagnostic tests. However, its effect on their sensitivity has not been clarified. In the present study, skin tests and the interferon-gamma (IFN- γ) assay were evaluated in a goat flock ($n = 177$) with a mixed tuberculosis–paratuberculosis infection in order to assess the possible effect of paratuberculosis on their sensitivity. Culture of mycobacteria was performed as the gold standard to determine the true infection status. All techniques showed lower sensitivities than previously described; the single intradermal tuberculin (SIT) test and the IFN- γ assay detected 71% (62.4–78.6, 95% C.I.) of the infected animals; the single intradermal cervical comparative tuberculin (SICCT) test detected only 42.7% (34.1–51.7, 95% C.I.) of infected animals. The highest level of sensitivity was obtained when SIT test and IFN- γ assay were combined in parallel (90.8%, 84.5–95.2, 95% C.I.). Sensitivities of the tests were also assessed by comparing animals suffering tuberculosis and animals with a mixed infection; tests were found to be more effective in the former group. Paratuberculosis seems to have a major effect in the sensitivity of the diagnostic tests under study, and therefore must be taken into account; in particular, the use of the SICCT test should be questioned when both tuberculosis and paratuberculosis are present.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Tuberculosis; Paratuberculosis; Goat; Skin test; SIT; SICCT; IFN- γ ; Sensitivity

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943721; fax: +34 91 3943795.
E-mail address: alaranaz@vet.ucm.es (A. Aranaz).

1. Introduction

Caprine tuberculosis can be caused by *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* (Gutierrez et al., 1995; Aranaz et al., 2003); both pathogens represent a serious concern because of the economic impact and possible spread to bovine herds. Moreover, it represents a potential source of infection to humans through unpasteurised dairy products and direct contact (Gutierrez et al., 1997; Kubica et al., 2003).

Paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), also causes reduced production. The involvement of *Map* in the development of Crohn's disease has not been demonstrated but its zoonotic potential is still under study (Grant, 2005). In Spain, several studies indicate that it is present in all domestic ruminant species with variable prevalences (Reviriego et al., 2000; de Juan et al., 2006a).

Several diagnostic tests are used to ascertain the tuberculosis status. The single intradermal tuberculin (SIT) test measures the cell mediated immune (CMI) response to a *M. bovis* purified protein derivative (PPD). As some of the proteins in PPD tuberculin are shared among different mycobacterial species (Aagaard et al., 2003), false positive reactions have been described in animals exposed to other mycobacteria (de la Rua-Domenech et al., 2006). To limit those false positive results, the single intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test compares the response to the bovine PPD against an avian PPD (Paterson et al., 1958). Therefore, specificity of the test is increased, though its sensitivity might be hampered, especially in adult animals (Collins, 2006).

The interferon-gamma (IFN- γ) assay is an *in vitro* alternative that has demonstrated a higher sensitivity compared with the intradermal tuberculin tests (Wood et al., 1992; Liebana et al., 1998; Gonzalez Llamazares et al., 1999) and can detect infected animals at an earlier stage (Gormley et al., 2006); therefore, it has been proposed as an ancillary test in cattle (Council Directive 64/432/EEC, amended by (EC) No. 1226/2002 of 8 July 2002, Anon., 2002).

In certain areas of the European Union co-infection with *M. bovis* or *M. caprae* and *Map* may occur in a same herd. The effect of paratuberculosis in the induction of false positive responses has been already studied in cattle (Walravens et al., 2002; Dunn et al., 2005), but little has been investigated about the

possible effect of a natural mixed tuberculosis–paratuberculosis infection in the sensitivity of diagnostic tests. Previous studies demonstrated a decreased sensitivity of these tests when applied to cattle previously infected with *M. avium* (Amadori et al., 2002; Hope et al., 2005). In a preliminary study, the sensitivity of SICCT and IFN- γ test in a cattle herd with dual tuberculosis–paratuberculosis infection (Aranaz et al., 2006) was lower than in previous reports, but the selection of animals may have resulted in an artificially biased higher sensitivity.

No investigation regarding the sensitivity of diagnostic tests in goat flocks with a dual infection has been published, in spite of the possible impact on control programs. The aim of the present study was to evaluate the sensitivity of SIT, SICCT and IFN- γ tests in a goat flock with a natural tuberculosis–paratuberculosis infection in order to determine the possible effect of paratuberculosis on their accuracy in detecting tuberculosis infection.

2. Material and methods

2.1. Flock and design of the study

This study was performed on a flock of Spanish *Guadarrama* breed with a previous diagnosis of both *M. caprae* and *Map* infection. The flock was composed of 177 goats older than 2 years that had never been vaccinated against paratuberculosis. Seroprevalence against *Map*, estimated by ELISA (*Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit, Parachek™ Johne's Absorbed EIA), was 64.4%. All goats were analysed using the SIT test, the SICCT test and the IFN- γ detection assay. Animals were euthanized and necropsied for the collection of samples for bacteriology.

The goats included in this field trial were not experimental animals. Handling of the animals, sampling and euthanasia were performed by veterinarians according to Spanish Legislation.

2.2. Diagnostic tests

2.2.1. Skin tests

SIT and SICCT were performed after blood sampling for IFN- γ using official bovine and avian

PPDs (CZ Veterinaria, Porriño, Spain). Animals were inoculated 0.1 mL containing 0.1 mg of bovine PPD (2500 CTU) on the left side of the neck and 0.1 mL (2500 IU) avian PPD on the right side. The results were determined by measuring the increase of the skin-fold thickness 72 h later.

Regarding the SIT test, animals were classified as positive if a bovine reaction (increase of the skin-fold thickness after the application of the bovine PPD) of two or more millimetres or the presence of clinical signs such as oedema, exudation, necrosis, pain or inflammation at the injection site were observed (severe interpretation).

Animals were considered positive for the SICCT test if a positive bovine reaction of two or more millimetres was observed which was greater than the avian reaction, or if the presence of clinical signs at the injection site of the bovine PPD were observed (severe interpretation).

2.2.2. *In vitro* test (IFN- γ test)

Blood samples were stimulated with the avian and bovine PPDs used in the skin tests as previously described (Liebana et al., 1998). Plasma was tested in duplicate using a sandwich EIA kit for bovine IFN- γ (BovigamTM Bovine Gamma Interferon Test) according to methods described by the supplier (Prionics, Schlieren, Switzerland). The interpretation of the test has been described elsewhere (Aranaz et al., 2006). Two cut-off points were selected to evaluate the sensitivity: the “severe interpretation” considered an animal positive when the mean optical density (OD) of its sample stimulated with bovine PPD minus the mean OD of nil antigen was greater than 0.05, and greater than the same value of the sample stimulated with avian PPD; the “standard interpretation” declared an animal positive if the same data was above 0.1. Interpretation of the test was also performed just using the results of the stimulation with bovine PPD to check if significant differences could be observed.

2.3. Bacteriology

2.3.1. Tissue collection

Samples from lung and retropharyngeal, mediastinal and bronchial lymph nodes were taken for culture of *M. tuberculosis* complex; samples from ileocecal

valve and adjacent tissue, and mesenteric lymph nodes were taken for *Map* culture. All samples were stored at -20°C until analysis.

2.3.2. *M. tuberculosis* complex culture

Samples for culture included tuberculosis compatible lesions and the adjacent areas, or a pool of the collected tissues if no macroscopic lesion was observed. Tissue samples were homogenized with sterile distilled water and decontaminated with 0.35% hexadecylpyridinium chloride (HPC) for 30 min (Corner and Trajstman, 1988), centrifuged at $1068 \times g$ for 30 min and cultured onto Coletsos and 0.2% (w/v) pyruvate-enriched Löwenstein–Jensen media (bioMérieux España and Biomedics, Madrid, Spain). Isolates were identified by staining for acid-alcohol fastness and PCR amplification of *Mycobacterium* genus-specific 16S rRNA fragment and MPB70 sequence (Wilton and Cousins, 1992). Isolates were characterised using spoligotyping (Kamerbeek et al., 1997).

2.3.3. *Map* culture

Samples of each animal were pooled, decontaminated using 0.75% HPC for 18 h (Greig et al., 1999) and inoculated onto selective media (de Juan et al., 2006b). Isolate identification was confirmed by mycobactin-dependency, and specific PCR for the detection of IS900 and f57 sequence (Coetsier et al., 2000). Isolates were further characterised using the PCR test described by Collins et al. (2002).

2.3.4. Classification of the animals according to the culture results

To evaluate the performance of the diagnostic test for tuberculosis depending on their infection status, animals were classified using the culture result as the gold standard. Animals that showed lesions compatible with tuberculosis but had negative culture results ($n = 14$) were excluded from the study to avoid considering them as negative.

Secondly, in order to determine if paratuberculosis infection could produce significant differences in the reliability of the tests, tuberculosis-infected animals were classified as (1) animals positive to tuberculosis: all animals from which *M. caprae* was cultured regardless of *Map* culture results, and (2) animals positive to tuberculosis and paratuberculosis (tbc+/*Map*).

Table 1

Culture results of *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) of the animals included in this study ($n = 163$)^a

Culture results	<i>Map</i> +	<i>Map</i> –	Total
<i>M. caprae</i> +	24	107	131
<i>M. caprae</i> –	6	26	32
Total	30	133	163

^a After the exclusion of 14 animals with lesions compatible with tuberculosis but negative culture of *M. caprae*.

ptb+): only animals from which both *M. caprae* and *Map* were isolated from their tissues.

Statistical analysis of the data was carried out using the software PEPI 4.0 (Computer Program for Epidemiologist), J.H. Abramson and P.M. Gahlinger.

3. Results

3.1. Culture results

After completing the *in vivo* tests, all animals ($n = 177$) were tested by bacteriology. Fourteen animals showing tuberculosis-compatible lesions but negative to *M. caprae* culture were excluded from the study to overcome a possible lack of sensitivity of the culture procedure. From the remaining 163 goats, *M.*

caprae was isolated from 131 animals (74%), and 30 (18.4%) were positive for the culture of *Map* (Table 1).

All the *M. caprae* isolates belonged to the spoligotype SB1084, and all *Map* isolates were classified as cattle type (type II).

3.2. Assessment of the diagnostic tests

Sensitivity for each test was calculated using the culture results as the gold standard (Table 2). The SICCT test was the least sensitive, detecting only 56 out of 131 (42.7%) infected animals, even though a severe interpretation was applied. The tests that detected the maximum number of infected animals were both SIT test and IFN- γ assay when the cut-off point was fixed in 0.05 ("severe interpretation"). If the results of the stimulation with avian PPD were ignored in the interpretation of the IFN- γ assay, the sensitivity did not change significantly, regardless of the cut-off point (Table 2).

Animals with a positive culture of *M. caprae* are represented on the basis of their skin tests results in Fig. 1. SIT test detected 37 (28.2%) more infected animals than SICCT, but 38 animals remained undetected by both skin tests. Twenty-six of those

Table 2

Sensitivity of the diagnostic tests performed in the flock ($n = 163$)

Diagnostic test	Positive reactors	True positives ^a	S (95% C.I.)
SIT test (severe interpretation)	118	93	71 (62.4–78.6)
SICCT test (severe interpretation)	69	56	42.7 (34.1–51.7)
Standard IFN- γ detection test (cut-off point = 0.1)	86	76	58 (49.1–66.6)
Standard IFN- γ detection test (no avian PPD) ^b	90	79	60.3 (51.4–68.7)
Severe IFN- γ detection test (cut-off point = 0.05)	109	93	71 (62.4–78.6)
Severe IFN- γ detection test (no avian PPD) ^b	114	96	73.3 (64.9–80.6)

^a True positive: positive reactor animals with *M. caprae* infection confirmed by culture.

^b Results obtained when the results of the stimulation with avian PPD are ignored.

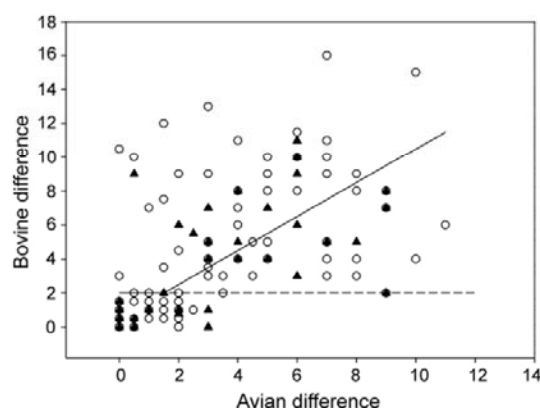


Fig. 1. Culture positive animals for tuberculosis ($n = 131$) represented based on their reaction to the skin tests and IFN- γ results. The continuous line represents the threshold of the SICCT test (animals over this line are those detected by SICCT test). The dashed line represents the threshold of the SIT test (animals over this line are those detected by SIT test). (X) Difference in mm after the inoculation of avian PPD. (Y) Difference in mm after the inoculation of bovine PPD. (○) Animals with positive values in the IFN- γ assay. (▲) Animals with negative values in the IFN- γ assay.

Table 3

Sensitivity obtained combining the diagnostic tests performed in the flock ($n = 163$)

Diagnostic tests in parallel	Positive reactors	True positives ^a	S (95% C.I.)
Severe SIT + standard IFN- γ	142	115	87.8 (80.9–92.9)
Severe SIT + severe IFN- γ	149	119	90.8 (84.5–95.2)
Severe SICCT + standard IFN- γ	118	99	75.6 (67.3–82.7)
Severe SICCT + severe IFN- γ	131	108	82.4 (76.5–89.8)

^a True positive: animals with a *M. caprae* infection confirmed by culture.

Table 4

Agreement analysis between SIT test and IFN- γ assay in the tuberculosis-culture positive animals ($n = 131$)

	IFN- γ positive	IFN- γ negative
SIT positive	67	26
SIT negative	26	12

animals were detected by the IFN- γ assay, and thus 12 remained undetected. *Map* infection was confirmed by culture in 5 out of those 12 animals.

When the different tests are combined in parallel, the best sensitivity was obtained when SIT and “severe” IFN- γ assay are used together (90.8%) (Table 3).

Results of SIT test and IFN- γ assay in the tuberculosis-infected animals ($n = 131$) are compared

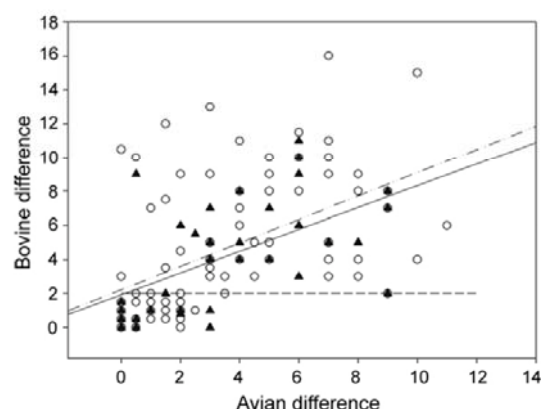


Fig. 2. Culture positive animals for tuberculosis ($n = 131$) represented based on their reaction to the skin tests, and regression lines of positive (dot-dashed line; $y = 0.69x + 2.2$) and negative (continuous line; $y = 0.64x + 1.9$) animals in the IFN- γ assay. The dashed line represents the threshold of the SIT test (2 mm). (X) Difference in mm after the inoculation of avian PPD. (Y) Difference in mm after the inoculation of bovine PPD. (○) Animals with positive values in the IFN- γ assay. (▲) Animals with negative values in the IFN- γ assay.

in Table 4. The agreement found between the two tests was very low (Kappa = 0.036, C.I. 95%, –0.135 to 0.207). The same result was obtained when the IFN- γ assay results were compared with the SICCT readings (Kappa = 0.036, C.I. 95%, –0.109 to 0.181). The regression lines for positive and negative animals in the IFN- γ test were also determined and compared (Fig. 2). Both lines showed a similar equation ($y = 0.69x + 2.2$ and $y = 0.64x + 1.9$).

Following the criteria detailed above, results obtained from all tuberculosis-infected animals ($n = 131$) were compared with those from the subgroup of animals with mixed infection (tbc+/ptb+) ($n = 24$) (Table 5). SIT test showed a lower sensitivity in the animals with the dual infection (54.2%) than that achieved in the overall group (71%); differences were found to be statistically significant (C.I. 95%). SICCT test also performed worse in the tbc+/ptb+ group, but the differences were not found to be significant (C.I. 95%). IFN- γ assay showed a similar sensitivity in both groups regardless the threshold applied. The small differences found between the two groups were not statistically significant (C.I. 95%).

4. Discussion

Bovine tuberculosis is subject of control and eradication programs in many countries worldwide; these programs are based on the early detection and removal of infected animals, and therefore they rely on the sensitivity of available diagnostic tests. In this sense, the presence of non-tuberculous mycobacteria has been pointed out as a possible cause of misdiagnosis (Lauzi et al., 2000; Dunn et al., 2005). Caprine tuberculosis is also important, as it can jeopardise the success of the programs for bovine tuberculosis and represents a public health threat.

Table 5
Sensitivities with confidence intervals (95%) of the tests in the groups formed based on culture results

Diagnostic test	Tbc+ ^a (n = 131)	Tbc+/Ptb+ ^b (n = 24)
Severe SIT	71 (62.4–78.6)	54.2 (33–74)
Severe SICCT	42.7 (34.1–51.7)	29.2 (13–51)
Standard IFN- γ detection test (0.1)	58 (49.1–66.6)	58.3 (37–78)
Severe IFN- γ detection test (0.05)	71 (62.4–78.6)	66.7 (45–84)
Severe SIT + standard IFN- γ	87.8 (80.9–92.9)	75 (53–90)
Severe SIT + severe IFN- γ	90.8 (84.5–95.2)	79.2 (58–93)
Severe SICCT + standard IFN- γ	75.6 (67.3–82.7)	70.8 (49–87)
Severe SICCT + severe IFN- γ	82.4 (76.5–89.8)	75 (53–90)

^a Animals with *M. caprae* positive cultures, regardless *Map* culture results.

^b Animals with positive cultures of both *M. caprae* and *Map*.

In the present study, we have applied an adaptation of the diagnostic tests used in cattle to a goat flock with a mixed infection of tuberculosis and paratuberculosis. The sensitivity observed in all tests was lower than results published by other authors for cattle (Francis et al., 1978; Wood et al., 1992; Whipple et al., 1995) and goats (Gutierrez et al., 1998; Liebana et al., 1998). As there are no established criteria for the interpretation of the skin tests in goats, in this study we have adopted the criteria of the European legislation for cattle but considering positive the inconclusive reactors (animals with a bovine reaction of more than 2 mm and less than 4 mm with no clinical signs at the injection site in the SIT test; and animals with a bovine reaction of more than 2 mm but equal to or less than an avian reaction and the absence of clinical signs in the SICCT test). SIT test, under a severe interpretation, showed the highest sensitivity, as it detected 71% of the infected animals, which lies within previously described sensitivity rates though on the lower side.

To avoid a possible lack of specificity of the SIT test, the application of the SICCT test has been recommended in areas where a high number of avian reactors are expected (Monaghan et al., 1994). However, in this study the SICCT test was an unreliable test, as it could only detect 42.7% of the infected animals even when the severe interpretation was applied. These data show that SICCT test is not adequate for diagnosis of tuberculosis in goats if tuberculosis and paratuberculosis coexist in the same flock.

The low sensitivities observed in the present study are most likely caused by a particular cause such as the paratuberculosis co-infection. Another possible explanation for the decreased sensitivity could be the presence of high rates of anergic animals in the flock

that would not produce a detectable immune response. However, this possibility was ruled out because a high proportion of false negative reactors showed a response to the stimulation with the avian PPD in the SICCT test. Therefore, a plausible explanation was the masking effect of the reaction against avian PPD in animals with a mixed infection.

To confirm if paratuberculosis infection was affecting the sensitivity of the tuberculosis diagnostic tests, we have compared the results obtained from all tuberculosis-infected animals with those from goats with a mixed infection. This comparison revealed that SIT test performed significantly better in the former group (Table 5), as the differences between sensitivities in each group were statistically significant (C.I. 95%). This observation points out the possible effect of the paratuberculosis co-infection in the performance of the SIT test. The same remark can be done regarding the SICCT test, though in this case the differences found were not statistically significant (C.I. 95%). However, this could be attributed to the small size of the tbc+/ptb+ group.

The detection of IFN- γ has been accepted as a useful ancillary tool in the diagnosis of tuberculosis in cattle. In our study, IFN- γ assay with the cut-off point fixed at 0.05 showed the same sensitivity as the SIT test in the whole flock. It must be remarked that ignoring the results of stimulation with avian PPD allows the detection of a few more infected animals. Thus, in situations of goat populations with a mixed tuberculosis–paratuberculosis infection, the IFN- γ assay might show the same sensitivity but better specificity than skin tests. In addition, it might be more cost-effective to perform IFN- γ assay stimulating the lymphocytes only with bovine PPD. The cut-off value

of the ELISA for the IFN- γ must be adjusted to obtain a higher sensitivity (in our study, PPD minus the mean OD of nil antigen greater than 0.05 instead of 0.1). Interestingly, the sensitivity rates of the IFN- γ assay obtained in the two groups (tuberculosis-infected and mixed infection animals) showed no statistically significant differences (confidence level 95%), which could imply that this test is not as influenced by a concurrent paratuberculosis in a flock than the skin tests. Adverse effects of the paratuberculosis on the sensitivity of the tuberculosis diagnostic tests used in this study (SIT, SICCT and IFN- γ detection tests) were also reported in cattle with a dual mycobacterial infection (Aranaz et al., 2006).

Comparison between IFN- γ assay and SIT test in the infected animals revealed a low agreement, meaning they behaved differently, detecting different populations of infected animals. This is also observed in Figs. 1 and 2, as the IFN- γ test results are distributed independently of the quantitative skin test results throughout the whole graphic. This is in line with the general assumption that some infected animals might respond to only one test, so the population which is positive to each test is not exactly the same (Neill et al., 1994; Pollock et al., 2005; Aranaz et al., 2006), and highlights the importance of the use of the IFN- γ assay as an ancillary test.

Twelve out of 131 infected animals (9.16%) did not show any CMI response. They are represented in the bottom left corner of Fig. 1. *Map* was isolated from five of them. However, *M. caprae* was cultured from the intestinal samples of other four animals, and therefore could have overgrown a possible culture of *Map*. No obvious cause for the lack of response, apart from a concomitant *Map* infection, was found. These animals represent a great risk, as they were not detected by any diagnostic technique and therefore would have maintained the tuberculosis infection in the farm. On the other side, nine of these animals showed macroscopic lesions compatible with tuberculosis, and therefore could have been detected in the slaughterhouse.

5. Conclusion

- The sensitivities of the diagnostic tests were below the values described in previous reports, and

paratuberculosis co-infection was considered the most likely cause.

- The SICCT test was the least sensitive test, probably because the paratuberculosis infection induced an important reaction to the avian PPD. Therefore, the use of SICCT test in goats in areas where tuberculosis and paratuberculosis are present should be discouraged.
- Skin tests and IFN- γ detection assay detected different populations of infected animals. This highlights the usefulness of IFN- γ assay as an ancillary test. In our study, IFN- γ detection test seemed to be more consistent regardless the concomitant paratuberculosis infection as compared to skin tests.
- Some infected animals (12/131, 9.16%) were undetectable for the tuberculosis diagnostic tests used in this study. Nine of these “undetectable” animals (75%) could have been detected in the slaughterhouse because of their visible lesions; this points out post-mortem inspection as a still essential tool in eradication plans for tuberculosis.

Paratuberculosis represents a serious impairment on the reliability of routine tuberculosis diagnosis tests in goats, and should be taken into account in eradication programs in areas with high paratuberculosis prevalences. Moreover, the impact of paratuberculosis in the sensitivity of these diagnostic tools in cattle should also be addressed in further studies, because of the economic and social consequences of a failure of the diagnostic tests. Above all, a great deal of common sense added to the use of the best diagnosis tools and proper epidemiological studies are necessary elements of the eradication programs, as the overall assessment of the situation of each epidemiological unit cannot rely exclusively on the results of the diagnostic tests.

Acknowledgements

This research was funded by project AGL2004-08092 of the Spanish Ministry of Science and Technology, and by ParaTBTools (STREP 23106) of the European Union. J. Álvarez was recipient of a predoctoral grant assigned by the Spanish Ministry of Education and Culture. The group is a partner of the

coordination action “Veterinary European Network on Mycobacteria (VENoMYC)” funded by the European Union. We would like to thank C. Escribano, L. Carbajo, J.L. Paramio, (Dirección General de Ganadería, Spanish Ministry of Agriculture Fisheries and Food), L. Sánchez, J. Carpintero, R. Díaz, (Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Comunidad de Madrid), and B. Fernández-Mardomingo, O. Mínguez-González, A. Grau and S. Marques (Dirección General de Producción Agropecuaria, Junta de Castilla y León) for their continuous encouragement.

We thank P. Díez de Tejada and J.M. Fernández for clinical assistance and appreciate the technical help of F. Lozano and N. Moya. We are grateful to M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

References

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meng, O.L., Andersen, P., Pollock, J.M., 2003. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3719–3728.
- Amadori, M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Telo, P., Pacciarini, L., Bonizzi, L., 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 89–96.
- Anon., 2002. Off. J. Eur. Union L179, 13–18.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov. sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1785–1789.
- Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., López-Sánchez, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37, 593–606.
- Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Denef, J.F., Cocito, C., Gala, J.L., 2000. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3048–3054.
- Collins, D.M., De Zoete, M., Cavaignac, S.M., 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4760–4762.
- Collins, J.D., 2006. Tuberculosis in cattle: strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.* 112, 369–381.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C., 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet. Microbiol.* 18, 127–134.
- de Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006a. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* sub-species *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102–110.
- de Juan, L., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Domínguez, L., 2006b. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927–5932.
- de la Rua-Domenech, Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190–210.
- Dunn, J.R., Kaneene, J.B., Grooms, D.L., Bolin, S.R., Bolin, C.A., Bruning-Fann, C.S., 2005. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 429–435.
- Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W., O’Boyle, D., Lumsden, M.J., Frost, A.J., 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103, 420–425.
- Gonzalez Llamazares, O.R., Gutierrez Martin, C.B., Álvarez, N.D., de la Puente Redondo, V.A., Domínguez, R.L., Rodríguez Ferri, E.F., 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet. Microbiol.* 70, 55–66.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet. Microbiol.* 112, 171–179.
- Grant, I.R., 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1282–1293.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E., McKendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746–1751.
- Gutierrez, M., Samper, S., Gavigan, J.A., Garcia Marin, J.F., Martin, C., 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2953–2956.
- Gutierrez, M., Samper, S., Jimenez, M.S., Van Embden, J.D., Marin, J.F., Martin, C., 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3328–3330.
- Gutierrez, M., Tellechea, J., Garcia Marin, J.F., 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol.* 62, 281–290.
- Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Howard, C.J., 2005. Exposure to *Mycobacter-*

- ium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. Clin. Exp. Immunol. 141, 432–439.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van, A.M., van, S.D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van, E.J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35, 907–914.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S., 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin. Microbiol. 41, 3070–3077.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, L.L., Poli, G., Bonizzi, L., 2000. Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. Vet. J. 160, 17–24.
- Liebana, E., Aranaz, A., Urquía, J.J., Mateos, A., Dominguez, L., 1998. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. Aust. Vet. J. 76, 50–53.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40, 111–124.
- Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock, J.M., Clements, A., Walton, E., Bryson, D.G., 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet. Rec. 135, 134–135.
- Paterson, A.B., Stuart, P., Lesslie, I.W., 1958. The use of tests on slaughterhouse cattle for estimating relative potencies of tuberculin and for the calculation of discrimination tests. J. Hyg. (Lond.) 56, 1–18.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 37–43.
- Reviriego, F.J., Moreno, M.A., Dominguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. Prev. Vet. Med. 43, 43–51.
- Walravens, K., Marche, S., Rosseels, V., Wellemans, V., Boelaert, F., Huygen, K., Godfroid, J., 2002. IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 401–406.
- Whipple, D.L., Bolin, C.A., Davis, A.J., Jarnagin, J.L., Johnson, D.C., Nabors, R.S., Payeur, J.B., Saari, D.A., Wilson, A.J., Wolf, M.M., 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. Am. J. Vet. Res. 56, 415–419.
- Wilton, S., Cousins, D., 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. PCR Methods Appl. 1, 269–273.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifiis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., de Witte, K., 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 31, 71–79.

ESTUDIO 2

Elsevier Editorial System (tm) for Veterinary Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of paratuberculosis in the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay

Article Type: Short Communication

Section/Category:

Keywords: tuberculosis; paratuberculosis; cattle; interferon-gamma; diagnosis

Corresponding Author: Dr. Alicia Aranaz, PhD

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

First Author: Julio Alvarez, DVM

Order of Authors: Julio Alvarez, DVM; Lucia de Juan, DVM, PhD; Javier Bezos, DVM; Beatriz Romero, BSc; Jose L Saez, DVM; Sergio Marques, DVM; Concepcion Dominguez, DVM; Olga Minguez, DVM, PhD; Baudilio Fernandez-Mardomingo, DVM; Ana I Mateos, BSc, PhD; Lucas Dominguez, DVM, PhD; Alicia Aranaz, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

Manuscript

1 **Effect of paratuberculosis in the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd**
2 **with a mixed infection using interferon-gamma detection assay**

3

4 Julio Álvarez^a, Lucía de Juan^a, Javier Bezos^a, Beatriz Romero^a, Jose Luis Sáez^b, Sergio
5 Marqués^c, Concepción Domínguez^d, Olga Mínguez^c, Baudilio Fernández-Mardomingo^c,
6 Ana Mateos^a, Lucas Domínguez^a, Alicia Aranz^{a*}

7

8 ^a Laboratorio Visavet, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
9 Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

10 ^b Subdirección General de Sanidad Animal, Dirección General de Ganadería, Ministerio
11 de Agricultura, Pesca y Alimentación, 28071 Madrid, Spain.

12 ^c Dirección General de Producción Agropecuaria, Servicio de Sanidad Animal, Junta de
13 Castilla y León, 47014 Valladolid, Spain

14 ^d Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Castilla y León, 24193 León, Spain

15 *Corresponding author:

16 Alicia Aranz, Laboratorio Visavet, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de
17 Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34 91
18 3943721, Fax: +34 91 3943795, e-mail address: alaranaz@vet.ucm.es

19 **Abstract**

20 Interferon-gamma (IFN- γ) detection assay is being applied as an ancillary test to
21 tuberculin tests in the diagnosis of bovine tuberculosis to detect the maximum number
22 of infected animals. Among possible factors influencing the performance of
23 tuberculosis-diagnostic tests, paratuberculosis, a widespread disease in Spain and other
24 European countries, has been pointed out as a cause of false positive reactions. Still, its
25 effect on the sensitivity of these tests in cattle remains to be fully characterized. In the
26 present study, impact of paratuberculosis in the apparent sensitivity of IFN- γ assay was
27 evaluated in a bullfighting cattle herd with a mixed tuberculosis-paratuberculosis
28 infection, using culture of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*
29 *paratuberculosis* as the gold standard to determine the infection status of every animal.
30 A total of 218 animals were slaughtered and sampled for bacteriology after blood
31 sampling. IFN- γ assay showed a lower apparent sensitivity in animals with a mixed
32 infection (50%) compared to animals suffering only tuberculosis (93.3%). These
33 differences were statistically significant (C.I. 95%). This finding indicates that the
34 presence of paratuberculosis in tuberculosis-infected herds could imply a serious
35 impairment in the sensitivity of IFN- γ detection test.

36 *Keywords:* tuberculosis; paratuberculosis; cattle; IFN- γ ; diagnosis.

37 **1. Introduction**

38 Bovine tuberculosis, caused mainly by *Mycobacterium bovis* but also by other
39 *M. tuberculosis* complex members, is one of the most important zoonotic diseases
40 affecting cattle worldwide. It poses a threat to public health (Thoen et al., 2006), and
41 causes significant economic losses due to test-and-slaughter eradication programs and
42 limitations in international trade (Pollock and Neill, 2002). In spite of great efforts made
43 by governments and farming communities, the Officially Tuberculosis Free (OTF)
44 status has not yet been achieved in some countries in Europe. The lack of success in the
45 eradication programs in these countries has been attributed, among other important
46 causes, to the insufficient sensitivity of the applied diagnostic tests under certain field
47 conditions (Monaghan et al., 1994; Morrison et al., 2000).

48 In Spain the official national eradication program for bovine tuberculosis has
49 been applied systematically since 1986, although some sanitary action was already
50 underway in the dairy sector since the early 60's. Prevalence of bovine tuberculosis has
51 followed a decreasing trend from 11.14% (herd level) and 4.2% (individual level) in
52 1986 to 1.76% and 0.42% in 2006 (Anon., 2008). However, although was a rapid
53 reduction at first, it has reached a point where progress is more difficult. At present, the
54 detection and removal of the maximum number of *M. bovis* infected animals is the
55 crucial step. Therefore, the increase of the sensitivity of diagnostic tests is one key
56 objective. For this reason the interferon- γ (IFN- γ) detection assay was introduced in the
57 European legislation (Council Directive 64/432/EEC, amended by (EC) No. 1226/2002
58 of 8 July 2002, Anon. 2002) and adopted in the Spanish eradication program (Anon.,
59 2008) as an ancillary test for diagnosis in infected herds. This assay has shown a higher
60 sensitivity compared to skin tests and can detect animals at an earlier stage of infection
61 (Gormley et al., 2006), though its comparatively lower specificity under certain

62 circumstances (Lauzi et al., 2000) discourages its use as a screening test. The conditions
63 for an optimal use of this technique, already demonstrated in several countries (Wood et
64 al., 1990; Gormley et al., 2006), must be determined for the different epidemiological
65 situations present in Spain.

66 Among the possible factors compromising the accuracy of diagnostic tests,
67 interference due to sensitization to other mycobacteria, especially *Mycobacterium avium*
68 complex (MAC) members, has been studied before (Lauzi et al., 2000; Cagiola et al.,
69 2004; Dunn et al., 2005). However, to our knowledge the sensitivity of the conventional
70 diagnostic test in cattle naturally co-infected by *M. bovis* and *Mycobacterium avium*
71 *paratuberculosis* (*Map*) has not been studied under field conditions. A decreased
72 sensitivity was reported by Amadori et al. (2002) and Hope et al. (2005) in cattle
73 previously infected with *M. avium* under experimental conditions, but the number of
74 animals studied was limited in both cases, and the experimental infection with *M. avium*
75 might not reflect the field situation of a naturally mixed infection with a *M. tuberculosis*
76 complex member and *Map*. Aranaz et al. found sensitivity below 70% in both single
77 intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test and IFN- γ assay in a cattle
78 herd with a tuberculosis-paratuberculosis infection, but the number of animals with
79 positive culture was low, and the selection of slaughtered animals could have produced
80 an artificially biased higher sensitivity (Aranaz et al., 2006). In a study performed in a
81 goat flock also suffering a mixed infection, the sensitivity of the skin tests and IFN- γ
82 assay was found to be lower than in previous reports as well, especially in animals with
83 a confirmed mixed infection (Alvarez et al., 2007).

84 The present study was designed to determine the possible effect of natural co-
85 infection by *M. bovis* and *Map* on the performance of IFN- γ detection assay for the
86 diagnosis of tuberculosis in a bullfighting cattle herd.

87 2. Material and methods

88 2.1. Herd and design of the study

89 The study was performed in a cattle herd of bullfighting breed with a natural
90 mixed tuberculosis-paratuberculosis infection. The whole herd (n=680) was subjected to
91 analysis by single intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test, IFN- γ
92 detection assay and an ELISA for detection of antibodies against *Map*. All animals sent
93 to the slaughterhouse (n=218) due to positive results in any test or zootechnical reasons
94 were sampled to perform bacteriology.

95 2.2. Diagnostic methods

96 2.2.1. SICCT test

97 The SICCT test was performed by the Official Veterinary Services according to
98 European and national legislation (EU Council Directive 64/432/CEE and RD
99 2611/1996) after blood sampling for IFN- γ detection using bovine and avian PPDs (CZ
100 Veterinaria, Porriño, Spain).

101 2.2.2. IFN- γ detection test

102 Heparinized blood samples were collected from every animal and delivered to
103 the laboratory within 8 hours of collection at room temperature. Stimulation with avian
104 and bovine PPDs was carried out as previously described (Wood et al., 1990; Liebana et
105 al., 1998), and plasma samples were analysed in duplicate using a sandwich EIA for
106 detection of bovine IFN- γ (Bovigam™ Bovine Gamma Interferon Test, Prionics,
107 Schlieren, Switzerland). Results were interpreted as previously described (Aranaz et al.,
108 2006). Animals were considered positive if the mean optical density (OD) of a sample
109 stimulated with bovine PPD minus the mean OD of nil antigen was greater than 0.05
110 and greater than the same value of the sample stimulated with avian PPD (interpretation
111 prescribed in the Spanish eradication program).

112 2.2.3. Serology of paratuberculosis

113 Plasma samples were tested in duplicate using the absorbed ELISA kit
114 ParachekTM (Prionics, Schlieren, Switzerland) according to manufacturer's instructions.
115 Animals were considered positive when its mean OD minus the plate negative control
116 was greater than 0.100 as recommended by the manufacturer.

117 2.3. Bacteriology

118 2.3.1. Tissue collection

119 Animals were slaughtered at the abattoir, and samples were taken at the post-
120 mortem inspection for culture of *M. bovis* (retropharyngeal, mediastinal and bronchial
121 lymph nodes, and lung) and *Map* (mesenteric and ileocecal lymph nodes and ileocecal
122 valve). Samples were stored at -20°C until further analysis.

123 2.3.2. *M. bovis* culture and characterization

124 Tuberculosis compatible lesions were selected when present; otherwise, a pool
125 of tissues was used. Culture and identification of the isolates was performed as
126 described elsewhere (Corner and Trajstman, 1988; Wilton and Cousins, 1992). All
127 isolates were characterized using spoligotyping (Kamerbeek et al., 1997).

128 2.3.3. *Map* culture and characterization

129 Tissue samples of each animal were pooled and processed as described before
130 (Greig et al., 1997) and inoculated on selective culture media (de Juan et al., 2006).
131 Isolates were identified as *Map* based on their mycobactin- dependency and presence of
132 specific elements IS900 and f57 (Coetsier et al., 2000). Type of strain was determined
133 using the PCRs described by Collins et al. (2002) and by Castellanos et al. (2007).

134 2.4. Evaluation of diagnostic test

135 Infection status of each animal was determined using their culture results as the
136 gold standard. Animals showing lesions compatible with tuberculosis but negative

137 culture (n=2) were discarded to avoid classifying them as negative to *M. bovis*. The rest
138 of the animals analysed were classified as (i) animals affected only by tuberculosis
139 (only *M. bovis* could be isolated from their tissue samples); (ii) animals suffering only
140 paratuberculosis (when their culture of *M. bovis* was negative but *Map* was isolated
141 from the intestinal samples); and (iii) animals with a mixed infection (both *M. bovis* and
142 *Map* were recovered from their samples).

143 Statistical analysis was performed by means of the software PEPI 4.0 (Computer
144 Program for Epidemiologist), J.H. Abramson and P.M. Gahlinger.

145 3. Results

146 3.1. Bacteriology results

147 A total of 218 animals were slaughtered and sampled for bacteriology during the
 148 study. Ninety-eight were culled based on their positive results in the diagnostic tests for
 149 tuberculosis: six animals were positive to the SICCT test, 81 to the IFN- γ assay and 11
 150 to both techniques. Eighty-two other animals were slaughtered as they had positive
 151 values in the serology of paratuberculosis. The remaining 38 animals were slaughtered
 152 for zootechnical reasons. *M. bovis* and *Map* were isolated from 46 and 110 animals
 153 respectively (Table 1). Two of the animals negative to all tests showed lesions
 154 compatible with tuberculosis at the abattoir inspection, and both had subsequently *M.*
 155 *bovis* and *Map* positive-culture.

156 The 46 *M. bovis* isolates belonged to six spoligotypes, from which two were
 157 much more prevalent: SB0298 (n=29), SB0339 (n=12), SB0121 (n=2), and SB0120,
 158 SB1313 and SB1321 (n=1). Regarding the *Map* isolates, 80 (72.7%) belonged to the
 159 type II and 30 (27.3%) were type III.

160 3.2. Impact of infection status in tuberculosis diagnosis using IFN- γ assay

161 Animals were classified based on their culture results according to the criteria
 162 detailed above. Proportion of positive animals and apparent sensitivity were determined
 163 and compared in each group. Although a low apparent sensitivity of 78.3% for the IFN-
 164 γ assay was observed in the whole group of culled animals, a detailed analysis of the
 165 results reveals it could be mostly attributed to the animals with a mixed infection (Table
 166 2). Differences in the apparent sensitivities among the groups formed based on their
 167 culture results were statistically significant (C.I. 95%).

- 168 - Animals infected only with *M. bovis* (n=30): IFN- γ detection test was able to detect
 169 28 out of 30 (93.3%) of the infected animals (Table 2).

170 - Animals with dual *M. bovis* and *Map* infection (n=16): Eight of the 16 animals
 171 (50%) were positive reactors in the IFN- γ assay (Table 2). All the false negative
 172 reactors in this group (n=8) were also negative in the SICCT test. Remarkably, six
 173 out of eight negative animals in the IFN- γ test were positive in the Parachek
 174 ELISA, while most IFN- γ reactors (6/8) showed negative results in that ELISA
 175 (Table 3). None of the IFN- γ -negative animals presented lesions indicating
 176 disseminated tuberculosis.

177 3.3. Impact of infectious status in paratuberculosis diagnosis.

178 The ELISA for detection of *Map* antibodies detected a statistically significant
 179 (C.I. 95%) high proportion of *Map* infected animals in the group infected only by *Map*
 180 (75/94, 79.8%) compared with animals with a mixed infection (8/16, 50%) (Table 2).

181 No association was observed between the type of *Map* strain infecting an animal
 182 and the probability of being detected by any method.

183 4. Discussion

184 In spite of great efforts invested in the fight against tuberculosis, success in the
185 achievement of complete eradication has been inconsistent in certain regions or
186 countries (Neill and Pollock, 2000). Wildlife reservoirs (Corner, 2006) and
187 dissemination due to movement of infected animals (Johnston et al., 2005; Collins,
188 2006) have been pointed out as possible causes of this failure in some countries. Other
189 major factors hampering eradication programs are limitations of routine diagnostic tests
190 (mainly skin tests), in particular concerning their sensitivity (Monaghan et al., 1994;
191 Morrison et al., 2000). Diagnostic accuracy is a crucial issue in the test-and-slaughter
192 programs applied in Spain and many other countries, especially at the present low-
193 prevalence stage, when detection of all infected animals is crucial (Pollock et al., 2001).

194 Although the impact of paratuberculosis compromising the specificity of
195 tuberculosis diagnostic tests has been demonstrated (Cagiola et al., 2004; Dunn et al.,
196 2005), its effect on the sensitivity in cattle has not been determined in natural
197 conditions. However, paratuberculosis could be of great importance, as it is widespread
198 in certain areas of the European Union (Nielsen and Toft, 2007) and other parts of the
199 world (Kennedy and Benedictus, 2001). In the present study the proportion of *M. bovis*
200 infected animals detected by the IFN- γ assay seems to be greatly affected by the
201 presence of a concomitant *Map* infection: while 93% of the animals infected with *M.*
202 *bovis* with negative culture of *Map* were detected (100% if SICCT test and IFN- γ test
203 were used in parallel), only 50% of the animals with a mixed infection had positive
204 results.

205 These data corroborate the findings of a previous report in a goat flock (Alvarez
206 et al., 2007), where paratuberculosis seemed to have a major effect on the sensitivity of
207 tuberculosis diagnostic tests, especially on skin test, as the IFN- γ assay was less

208 affected. On the other hand, in the present study the ability of IFN- γ test to detect
209 tuberculosis-infected animals was more influenced by paratuberculosis; these
210 differences could be due to the host species or the strain present in each herd.

211 In the group of cattle with dual infection, 50% (8/16) of the animals were false
212 negative reactors in the IFN- γ assay. Interestingly, 75% of these animals were positive
213 in the serology of *Map*, in opposition to what happened to most animals positive in the
214 IFN- γ test in the same group (that were seronegative for *Map*) (Table 3). The negative
215 association between results in IFN- γ assay and serology of *Map* in animals with a mixed
216 infection was also observed in a previous report in goats (Alvarez et al., 2007) as from
217 eight false negative reactors to the IFN- γ assay found in that study, seven (87.5%) had
218 high titers of antibodies against *Map* (unpublished data).

219 Regarding the ELISA for detection of antibodies against *Map*, it is remarkable
220 that a lower apparent sensitivity was observed in the group of animals with a mixed
221 infection compared to the group of animals infected with *Map* but with negative *M.*
222 *bovis* cultures; this is contrary to what could be expected in animals with a heavy
223 bacterial burden, and therefore more likely to be seropositive.

224 In conclusion, our results would suggest that both *M. bovis* and *Map* influence
225 the overall immune response developed in the dually-infected animals, and may
226 compromise the reliability of diagnostic tests that are based in the measurement of
227 specific response generated against each pathogen. Significant differences in the
228 proportion of *M. bovis*-infected animals reacting to the IFN- γ assay were observed
229 depending on their paratuberculosis status: animals with dual infection were more likely
230 to give false negative reactions to this test. This fact highlights the importance of
231 ascertaining the paratuberculosis status of a herd when implementing a strategic use for
232 the IFN- γ assay, not only because its effect on the specificity but also for its impact on

233 the sensitivity. More studies with larger numbers of animals representing the actual
234 bovine population included in each group should be performed in order to confirm this
235 finding.

236 **Acknowledgements**

237 This research was funded by project AGL2006-06206 of the Spanish Ministry of
 238 Science and Technology, ParaTBTools (STREP 23106) of the European Union, and the
 239 Spanish Ministry of Agriculture, Food and Fisheries. J. Álvarez was recipient of a
 240 predoctoral grant assigned by the Spanish Ministry of Education and Culture. The group
 241 is a partner of the coordination action “Veterinary European Network on Mycobacteria
 242 (VENoMYC)” funded by the European Union.

243 We are grateful to F. Lozano and N. Moya for technical help; to the Official
 244 Veterinary Services for the IDTB testing and collection of blood samples; and to C.
 245 García, V. Bielsa, and A. Zabaleta [abattoir staff of Leganes (Madrid)] for assistance in
 246 collection of tissue samples. We would like to thank C. Escribano, L. Carbajo, and J. L.
 247 Paramio (Dirección General de Ganadería, Spanish Ministry of Agriculture Fisheries
 248 and Food) for their continuous encouragement. The willingness and cooperation of
 249 landowner is greatly appreciated. We acknowledge Matthew Gilmour for careful
 250 revision of the manuscript.

251 **References**

- 252 Alvarez, J., De, Juan L., Bezos, J., Romero, B., Saez, J. L., Gordejo, F. J., Briones, V.,
 253 Moreno, M. A., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2007. Interference of
 254 paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed
 255 infection. *Vet.Microbiol.* 128, 72-80.
- 256 Amadori, M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Telo, P., Pacciarini,
 257 L., and Bonizzi, L., 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves
 258 sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. *J.Vet.Med.B*
 259 *Infect.Dis.Vet.Public Health* 49, 89-96.
- 260 Anon., July 9, 2002. Off. J. Eur. Union L179, 13–18.
- 261 Anon., 2008. Programa nacional de erradicacion de tuberculosis bovina presentado por
 262 España para los años 2008-2010. Subdirección General de Sanidad Animal, Dirección
 263 General de Ganadería, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [http://](http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp)
 264 rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp
- 265 Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Alvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J. L.,
 266 Lopez-Sanchez, J., Mateos, A., and Dominguez, L., 2006. Assessment of diagnostic
 267 tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium*
 268 *bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Res.* 37, 593-606.
- 269 Cagiola, M., Feliziani, F., Severi, G., Pasquali, P., and Rutili, D., 2004. Analysis of
 270 possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-
 271 free cattle herds. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 11, 952-956.
- 272 Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., De, Juan L., Alvarez, J., Bezos, J., Rodriguez,
 273 S., Stevenson, K., Mateos, A., and Dominguez, L., 2007. Polymorphisms in *gyrA* and

- 274 *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III
275 isolates. J.Clin.Microbiol. 45, 3439-3442.
- 276 Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneef, J. F., Cocito, C., and Gala, J. L., 2000.
277 Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M.*
278 *avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle.
279 J.Clin.Microbiol. 38, 3048-3054.
- 280 Collins, D. M., De Zoete, M., and Cavaignac, S. M., 2002. *Mycobacterium avium*
281 subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test
282 based on a novel DNA sequence difference. J.Clin.Microbiol. 40, 4760-4762.
- 283 Collins, J. D., 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. Vet.
284 Microbiol. 112, 369-381.
- 285 Corner, L. A. and Trajstman, A. C., 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium
286 chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from
287 bovine lesions. Vet.Microbiol. 18, 127-134.
- 288 Corner, L.A.L., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of
289 tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol. 112, 303-312.
- 290 de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A.,
291 and Dominguez, L., 2006. Comparison of four different culture media for isolation and
292 growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains
293 isolated from cattle and goats. Appl.Environ.Microbiol. 72, 5927-5932.
- 294 Dunn, J. R., Kaneene, J. B., Grooms, D. L., Bolin, S. R., Bolin, C. A., and Bruning-
295 Fann, C. S., 2005. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp
296 *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on

- 297 results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in
298 cattle. J.Am.Vet.Med.Assoc. 226, 429-435.
- 299 Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., McGill, K., and Collins, J. D., 2006.
300 Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon
301 (Bovigam) assay. Vet.Microbiol. 112, 171-179.
- 302 Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., and Sharp, J. M., 1997.
303 Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet.Rec. 140, 141-143.
- 304 Hope, J. C., Thom, M. L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G.,
305 and Howard, C. J., 2005. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level
306 protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in
307 cattle. Clin.Exp.Immunol. 141, 432-439.
- 308 Johnston, W. T., Gettinby, G., Cox, D. R., Donnelly, C. A., Bourne, J., Clifton-Hadley,
309 R., Le Fevre, A. M., McInerney, J. P., Mitchell, A., Morrison, W. I., and Woodroffe, R.,
310 2005. Herd-level risk factors associated with tuberculosis breakdowns among cattle
311 herds in England before the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. Biol.Lett. 1, 53-56.
- 312 Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van, Agterveld M., van, Soolingen D., Kuijper, S.,
313 Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., and van, Embden J., 1997.
314 Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for
315 diagnosis and epidemiology. J.Clin.Microbiol. 35, 907-914.
- 316 Kennedy, D. J. and Benedictus, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp.
317 *paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev.Sci.Tech. 20, 151-179.
- 318 Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I. L., Poli, G., and Bonizzi, L., 2000.
319 Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-
320 free herds. Vet.J. 160, 17-24.

- 321 Liebana, E., Aranaz, A., Urquia, J. J., Mateos, A., and Dominguez, L., 1998. Evaluation
322 of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. Aust.Vet.J.
323 76, 50-53.
- 324 Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., and Quinn, P. J., 1994.
325 The tuberculin test. Vet.Microbiol. 40, 111-124.
- 326 Morrison, W. I., Bourne, F. J., Cox, D. R., Donnelly, C. A., Gettinby, G., McInerney, J.
327 P., and Woodroffe, R., 2000. Pathogenesis and diagnosis of infections with
328 *Mycobacterium bovis* in cattle. Independent Scientific Group on Cattle TB. Vet.Rec.
329 146, 236-242.
- 330 Neill, S. D. and Pollock, J. M., 2000. Testing for bovine tuberculosis--more than skin
331 deep. Vet.J. 160, 3-5.
- 332 Nielsen, S. S., Toft, N., 2007. Review of prevalences of paratuberculosis in farmed
333 animals in Europe. In: Proceedings of the 9th international colloquium on
334 Paratuberculosis, Tsukuba, Japan, October 29-November 2, pp. 70.
- 335 Pollock, J. M. and Neill, S. D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis
336 in cattle. Vet. J. 163, 115-127.
- 337 Pollock, J. M., Buddle, B. M., and Andersen, P., 2001. Towards more accurate
338 diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. Tuberculosis (Edinb.)81,65-69.
- 339 Thoen, C., Lobue, P., and de, Kantor, I., 2006. The importance of *Mycobacterium bovis*
340 as a zoonosis. Vet.Microbiol. 112, 339-345.
- 341 Wilton, S. and Cousins, D., 1992. Detection and identification of multiple
342 mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. PCR Methods Appl. 1,
343 269-273.

344 Wood, P. R., Corner, L. A., and Plackett, P., 1990. Development of a simple, rapid in
345 vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma
346 interferon. Res.Vet.Sci. 49, 46-49.

347

Table 1.

Mycobacterium bovis and *M. avium paratuberculosis* culture results of slaughtered animals (n=216)^a

Culture results	Map+	Map-	Total
<i>M. bovis</i> +	16	30	46
<i>M. bovis</i> -	94	76	170
Total	110	106	216

348 ^a After the exclusion of 2 animals with lesions compatible with tuberculosis but showing

349 negative culture of *M. bovis*.

350

Table 2.

Apparent sensitivities with confidence intervals (95%) of the IFN- γ detection test and theParachekTM ELISA in the groups formed based on culture results

Diagnostic test	All animals (n=218)	Tbc+/Ptb- ^a (n=30)	Tbc+/Ptb+ ^b (n=16)	Tbc-/Ptb+ ^c (n=94)
IFN- γ detection test	78.3 (60.4-86.4)	93.3 (77.9-99.2)	50 (24.6-75.3)	-
Parachek ELISA	57.3 (47.5-66.7)	-	50 (24.6-75.3)	79.8 (70.2-87.4)

351 ^a Animals with *M. bovis* positive / *Map* negative culture results352 ^b Animals with positive cultures of both *M. bovis* and *Map*353 ^c Animals with *Map* positive / *M. bovis* negative culture results

354

Table 3.

Results of IFN- γ assay and Parachek ELISA in animals suffering a tuberculosis-paratuberculosis dual infection (n=16)

Animal	Bovine IFN- γ^a	Avian IFN- γ^b	Parachek ELISA c
1	0,635	0,132	-0,012
2	0,529	0,080	0,008
3	0,314	0,263	-0,025
4	0,212	0,069	-0,025
5	0,161	0,044	0,384
6	0,157	0,036	-0,020
7	0,115	0,036	-0,026
8	0,051	0,016	0,126
9	0,035	0,077	1,048
10	0,136	0,139	0,883
11	0,239	0,888	0,400
12	0,070	0,141	0,242
13	0,007	0,005	0,213
14	0,007	0,017	0,210
15	0,018	0,024	0,013
16	0,017	0,002	-0,007

Optical densities above the cut-off point (positive animals) are presented in bold letters.

^a Results after the in-vitro stimulation with bovine PPD minus the value obtained after stimulation with PBS.

^b Results after the in-vitro stimulation with avian PPD minus the value obtained after stimulation with PBS.

^c Results in the ELISA for detection of *Map* antibodies

Capítulo IV

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA PRESENTE EN
Mycobacterium avium SUBSP. *hominissuis* MEDIANTE TÉCNICAS DE
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y VALORACIÓN DE LA SIGNIFICACIÓN
CLÍNICA DE SU AISLAMIENTO EN MUESTRAS HUMANAS NO ESTÉRILES

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *hominissuis* es el miembro del complejo *avium* que presenta una mayor heterogeneidad genética. A pesar de ser una sola subespecie, definida recientemente (en 2002), dentro de esta denominación se incluyen aislados que presentan importantes diferencias en su genotipo. Aunque está ampliamente distribuido en el medio ambiente y ha sido aislado de numerosas especies animales sin estar asociado a cuadros clínicos, puede ocasionar lesiones granulomatosas en linfonodos, especialmente en porcino, que dan lugar a un descenso en el valor económico de las canales. En humanos puede originar cuadros más o menos localizados en pacientes inmunocompetentes (patologías pulmonares, generalmente en pacientes con otras enfermedades predisponentes, o linfadenopatías, más frecuentes en niños), e infecciones generalizadas en pacientes inmunosuprimidos. La segunda presentación de la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* ha ido cobrando una importancia creciente debido al incremento en la población inmunocomprometida, fundamentalmente a causa de la epidemia de SIDA, el envejecimiento de la población en países del primer mundo y la implantación de terapias inmunosupresoras con fines terapéuticos.

A causa de su ubicuidad, el hallazgo de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* en muestras clínicas no estériles puede ser debido a colonizaciones transitorias en el paciente o a

contaminaciones ambientales de la muestra. Por ello la significación clínica del aislamiento de este microorganismo puede ser difícil de valorar, especialmente en pacientes sin patologías aparentes. En este contexto se diseñó un estudio destinado a evaluar la utilidad de varias técnicas de caracterización molecular para la identificación, tipificación y comparación de aislados del complejo *avium* procedentes de muestras humanas y ambientales de un mismo hospital, con el fin de establecer la importancia clínica de dichos aislados. Se incluyeron aislados procedentes de muestras humanas no estériles [orina (n=23) y esputo (n=19)], estériles [sangre (n=3), biopsia hepática (n=1) y médula ósea (n=1)], y muestras ambientales [agua de grifos y duchas de habitaciones de pacientes (n=6) y contenedores para la recogida de orina (n=11)]. La identificación bacteriana se realizó mediante la utilización de sistemas comerciales y la detección de secuencias de inserción (IS1245 y IS901), mientras que la caracterización molecular se llevó a cabo empleando la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y el estudio de la secuencia del gen *hsp65*.

Todos los aislados ambientales fueron identificados como *M. avium* subsp. *hominissuis*, así como 38 de los aislados clínicos (los nueve restantes resultaron ser *M. intracellulare*). Un elevado porcentaje (81.4%) de los aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis* no presentaban en su ADN el elemento IS1245, lo que representa un hallazgo inusual. Mediante el empleo de la técnica de PFGE y secuenciación del gen *hsp65* se comprobó que todos los aislados procedentes de muestras ambientales presentaban idéntico perfil, a pesar de haberse obtenido a lo largo de varios años y proceder de distintas áreas del hospital; esto parece indicar la presencia de una cepa de *M. avium* subsp. *hominissuis* que persiste en el sistema de distribución de agua de dicho hospital. El 91.3% de los aislados de orina y el 26.3% de los procedentes de muestras respiratorias resultaron idénticos a esta cepa ambiental al aplicar las mismas técnicas de tipificación. Sin embargo, todos los aislados de muestras clínicas estériles presentaron distintos patrones de PFGE y diferente secuencia de *hsp65* con respecto a la cepa ambiental, demostrando la ausencia de relación con la misma. La evaluación clínica de los pacientes cuyas muestras dieron lugar al crecimiento de la cepa presente en el ambiente concluyó que no estaban padeciendo un cuadro debido a *M. avium*, lo que indica que lo más probable es que su aislamiento se debiera a una contaminación de la muestra en su procesado. La caracterización de las cepas ambientales presentes en hospitales y centros de salud resulta muy conveniente para poder evaluar el riesgo de contaminaciones ambientales o infecciones nosocomiales.

La variabilidad presente en aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis* procedentes de distintas especies hospedadoras y áreas geográficas también ha sido evaluada con el fin de

determinar posibles factores asociados a diferentes fenotipos (patogenicidad, persistencia en el ambiente...). Así, se ha estudiado un panel formado con más de 100 cultivos procedentes de muestras humanas, animales (animales domésticos y de vida salvaje) y ambientales, mediante el estudio de polimorfismos de secuencia larga, presencia/ausencia de secuencias de inserción, secuenciación del gen *hsp65* y en algunos casos PFGE. Los resultados obtenidos indican que la diversidad presente en esta subespecie es mayor de la descrita anteriormente, de forma que algunas de las dianas que han sido utilizadas para su identificación podrían no ser totalmente sensibles o específicas. Las técnicas de caracterización molecular constituyen una herramienta fundamental para la realización de estudios epidemiológicos, y la elevada variabilidad presente en *M. avium* subsp. *hominissuis* hace que su aplicación en esta subespecie sea especialmente valiosa (manuscrito en preparación).

ESTUDIO

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2008, p. 1246–1251
0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01621-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 4

Genetic Diversity of *Mycobacterium avium* Isolates Recovered from Clinical Samples and from the Environment: Molecular Characterization for Diagnostic Purposes[†]

Julio Álvarez,¹ Ignacio Gómez García,² Alicia Aranaz,^{1*} Javier Bezos,¹ Beatriz Romero,¹ Lucía de Juan,¹ Ana Mateos,¹ Enrique Gómez-Mampaso,³ and Lucas Domínguez¹

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain¹;
Servicio de Urología, Hospital Virgen de la Salud, 45004 Toledo, Spain²; Servicio de Microbiología,
Hospital Ramón y Cajal, IMSALUD, 28034 Madrid, Spain³

Received 14 August 2007/Returned for modification 2 December 2007/Accepted 4 February 2008

Isolation of *Mycobacterium avium* complex (MAC) organisms from clinical samples may occur in patients without clinical disease, making the interpretation of results difficult. The clinical relevance of MAC isolates from different types of clinical samples ($n = 47$) from 39 patients in different sections of a hospital was assessed by comparison with environmental isolates ($n = 17$) from the hospital. Various methods for identification and typing (commercial probes, phenotypic characteristics, PCR for detection of IS1245 and IS901, sequencing of the *hsp65* gene, and pulsed-field gel electrophoresis) were evaluated. The same strain was found in all the environmental isolates, 21 out of 23 (91.3%) of the isolates cultured from urine samples, and 5 out of 19 (26.3%) isolates from respiratory specimens. This strain did not cause disease in the patients. Testing best characterized the strain as *M. avium* subsp. *hominissuis*, with the unusual feature that 81.4% of these isolates lacked the IS1245 element. Contamination of certain clinical samples with an environmental strain was the most likely event; therefore, characterization of the environmental mycobacteria present in health care facilities should be performed to discard false-positive isolations in nonsterile samples, mainly urine samples. Molecular techniques applied in this study demonstrated their usefulness for this purpose.

The clinical relevance of *Mycobacterium avium* complex (MAC) has increased in recent decades because of the rising population of immunocompromised individuals due to longer life expectancy, immunosuppressive chemotherapy, and AIDS pandemic (28). In AIDS patients, MAC is the most common nontuberculous mycobacteria causing disease, especially in developed countries, and usually produces disseminated infections (8, 16). However, MAC also causes infection in immunocompetent individuals with underlying pulmonary disease and in children with lymphadenitis or cystic fibrosis (10, 14, 16).

Mycobacterial species comprised in MAC have undergone reorganization based on biological, serological, and molecular characteristics (Table 1). The most important species causing disease in humans can be differentiated using PCR-based methods for the detection of the presence/absence of insertion sequences (IS): *M. avium* subsp. *avium* (37) presents IS901 (7, 21, 27) and low copy numbers of IS1245 (13, 17), *M. avium* subsp. *hominissuis* (25) usually harbors high numbers of IS1245 but no IS901 (25), and *Mycobacterium intracellulare* (32, 42) presents neither IS901 nor IS1245 (2). Other MAC species include *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, whose involvement in Crohn's disease is still under discussion (9), and *M. avium* subsp. *silvaticum* (37).

In spite of the environmental colonization and rising prev-

alence of disease due to members of MAC, the epidemiology of infection is still not clear. The routes of transmission have not been unambiguously identified, and human-to-human transmission has not been demonstrated. Mycobacteria belonging to MAC have also been detected in a wide range of animal species, including birds (mainly *M. avium* subsp. *avium*) (27), pigs (more frequently *M. avium* subsp. *hominissuis*), (19), and small vertebrates (11).

The environment is the most likely source of infection for humans, as *M. avium* is considered a ubiquitous organism and has been isolated from water (1), soil, and dust (15). Water distribution systems have been reported as a possible source of infection in hospitals, homes, and commercial buildings (1, 41); moreover, hospital water can also contaminate samples of uninfected patients, making the clinical significance of the MAC isolation unclear (38).

Current diagnosis is based on probes or PCR tests that occasionally are not able to discriminate between MAC species or subspecies. Several molecular biology techniques can be used for epidemiological studies in order to establish measures to control the dissemination of the infection. For this purpose, restriction fragment length polymorphism (RFLP) using IS1245 as a probe (40) has been widely used; however, the effectiveness of IS1245 RFLP is limited in *M. avium* strains harboring a low number of IS1245 copies.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has also been shown to be a useful technique for assessing the relatedness of strains among MAC (24). Nevertheless, PFGE requires a large amount of bacterial DNA for good visualization of the patterns. Other characterization techniques include sequencing of

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 3943721. Fax: 34 91 3943795. E-mail: alaranaz@vet.ucm.es.

[†] Published ahead of print on 13 February 2008.

TABLE 1. Characteristics of the most common MAC species causing human disease

Strain	Serotypes	Virulence for birds	IS901	IS1245	<i>hsp65</i> code(s) ^a	Reference(s)
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	1–3	Virulent	+	+	4	25, 37
<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	4–6, 8–11, 21	Partially virulent	–	+	1–3, 7–9	25
<i>M. intracellulare</i>	7, 12–20, 22–28	Avirulent	–	–	10–12, 14	32

^a According to Turenne et al. (39).

the 65-kDa heat shock protein gene (*hsp65*) (29, 39) and of the internal transcribed spacers (ITS) (26).

The aim of this study was to characterize the environmental strains of MAC present in a hospital using different molecular tests (IS1245 and IS901 detection, *hsp65* sequencing, and PFGE analysis) and to compare them with clinical isolates from patients from the same hospital in order to evaluate the possibility of nosocomial infections or contamination of samples.

MATERIALS AND METHODS

A total of 64 isolates belonging to MAC from a public hospital were analyzed. This hospital covers a population of 525,000 inhabitants and is located in Madrid (Spain). Forty-seven isolates were recovered from clinical samples obtained from patients from different sections of the hospital. The other 17 isolates were cultured from several environmental sources (tap water from various floors of the hospital and containers for the collection of urine samples). All the isolates were cultured in the period between 2002 and 2005.

Clinical *M. avium* isolates. Forty-seven MAC isolates were recovered from 12 AIDS patients and 27 patients not infected with human immunodeficiency virus (HIV). Initially, all patients showed clinical syndromes compatible with mycobacterial diseases (pneumonia, meningitis, pericarditis, etc.) though active mycobacterial infection was afterwards confirmed in only 13 patients based on clinical criteria. The isolates were processed according to Tacquet and Tison (34) and cultured in Coletos medium (BioMedics S.L., Tres Cantos, Madrid, Spain). Among these 47 isolates, 13 were sequential isolates cultured from identical or nonidentical sites from five patients (patient numbers 17, 18, 19, 35, and 36), and the rest were single isolates from 34 patients. Thirty-eight isolates were cultured from admitted patients, while the remaining nine isolates were obtained from nonadmitted patients. Most of the isolates were cultured from nonsterile sites (urine, *n* = 23; sputum, *n* = 19) except for five isolates (blood, *n* = 3; liver biopsy, *n* = 1; bone marrow, *n* = 1).

Environmental *M. avium* isolates. Eleven isolates were cultured from the intermediate containers used for the collection of urine samples in disabled patients and six were from tap water taken from the different patient's rooms at the hospital. Fifty milliliters of water was collected from the water taps of the patients' rooms into sterile tubes; the intermediate containers were cleaned following the standard procedure and then rinsed with 50 ml of sterile water that was afterwards collected into sterile tubes. These samples were centrifuged at 3,500 rpm for 30 min; the pellet was decontaminated according to Tacquet and Tison (34) and centrifuged again at 3,500 rpm. The pellet was then inoculated into Löwestein-Jensen medium supplemented with amphotericin (400 mg/liter), nalidixic acid (35 mg/liter), and lincomycin (2 mg/liter) and into Coletos (Bio-Medics S.L.) medium. Media were incubated at 36°C for up to two months.

Primary identification. Isolates were identified as MAC members by using the commercial AccuProbe MAC culture identification kit (Gen-Probe, CA) and by phenotypical characteristics: growth temperature at 25°C, 36°C, and 43°C; tellurite reduction; Tween 80 hydrolysis; nitrate reduction test; and sodium chloride tolerance (18).

PCR analysis. Bacterial cells were suspended in 200 µl of sterile water and boiled for 10 min; then they were centrifuged, and the supernatant was used as the DNA template for the PCRs. The identification of the isolates as *M. avium* or *M. intracellulare* was carried out by PCRs aimed at specific regions of the 16S rDNA (5, 43). PCR amplification of the insertion sequences IS901 and IS1245 was performed as described previously (13, 20). The PCR and sequencing of the *hsp65* gene were carried out as described previously in *M. avium* isolates (29, 35, 39).

For confirmation of the identity of the IS1245-negative *M. avium* isolates, 12 isolates were randomly selected (seven from urine samples and five from envi-

ronmental sources) and subjected to PCR amplification and restriction enzyme analysis (REA) of IS1311; amplified DNA was digested with the restriction enzymes HinfI and MseI (New England Biolabs, Hitchin, Hertfordshire, United Kingdom) as described elsewhere (23). Analysis of the 16S rDNA and 16S-23S rDNA ITS sequences was performed in four isolates (two environmental cultures and two isolates from urine samples) (5, 31). PCR primers used in all reactions are described in Table 2. Positive and negative controls were included in each batch of tests.

PFGE analysis. *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates were typed by PFGE analysis as described before (24). Briefly, bacterial cells were cast into low-melting-point agarose plugs and lysed with lysozyme (1 mg/ml), 1% sodium dodecyl sulfate, and proteinase K (1 mg/ml). Plugs containing DNA were digested with 20 U of XbaI for 4 h (New England Biolabs). The digested DNA was loaded in a 1% agarose gel and run in Tris-borate-EDTA buffer. PFGE was performed using a CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories Ltd.) at 14°C for 20 h at 200 V. Gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The PFGE patterns obtained were interpreted as proposed by Tenover et al. (36); isolates were considered closely related if differences of no more than 2 to 3 bands were observed between the obtained PFGE profiles.

TABLE 2. Primers used in this study for the identification and characterization of the MAC isolates

Name or target	Direction ^a	Sequence (5' to 3')	Reference(s)
Mycgen-F/R	F	AGAGTTTGATCTGGC TCAG	5, 43
	R	TGCACACAGGCCACAA GGGA	
Mycint	F	CCTTTAGGCGCATGTC TTTA	43
	R	TGCACACAGGCCACAA GGGA	
IS901	F	GCAACGGTTGTTGCTT GAAA	20
	R	TGATACGCCGGAATC GCGT	
IS1245	F	GCCGCCGAAACGAT CTAC	13
	R	AGGTGGCGTCGAGG AAGA	
IS1311	F	GCGTGAGGCTCTGTGG TGAA	23
	R	ATGACGACCGCTTGGG AGAC	
ITS	F	TTGTACACACCGCCC GTCA	31
	R	TCTCGATGCCAAGGCATC CACC	
<i>hsp65</i> 3' fragment	F	CGGTTTCGACAAGGGTT ACAT	39
	R	ACGGACTCAGAAGTCC ATGC	
<i>hsp65</i> 5' fragment ^b	F	ACCAACGATGGTGTGT CCAT	35
	R	CTTGTCGAACCGCATA CCCT	

^a F, forward; R, reverse.

^b Telenti fragment.

TABLE 5. Characterization of *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates cultured from sterile samples ($n = 4$) from three patients

Patient no.	Isolate reference	Sample	IS1245	<i>hsp65</i> sequevar	PFGE profile ^a	Infected with MAC ^b	Comment
37	MI06/00264	Liver biopsy	+	Code 3	Unrelated	Yes	HIV
39	MI05/03004	Blood	+	Code 1	Unrelated	Yes	HIV
19	MI06/00265 ^c	Blood	+	Code 1	NA	Yes	HIV
	MI06/03278 ^c	Blood	+	Code 1	NA	Yes	HIV

^a NA, not available.^b Based on clinical criteria.^c Patient with MAC isolates cultured from urine, sputum, and blood samples.

repetitive *M. avium* isolations in urine samples obtained using a catheter; the strain isolated presented a code 1 in the *hsp65* analysis, and its PFGE profile was considered unrelated to all the others obtained in the study.

Nineteen MAC isolates were cultured from sputum samples of 17 patients. Eight isolates were identified as *M. intracellulare*, seven of which were causing disease in immunocompetent patients, while one isolate could not be associated with any pathology. The remaining 11 isolates were identified as *M. avium* (Table 4), and four of these isolates were associated with disease in the patients (three of these isolates harbored IS1245 and contained different *hsp65* sequevars [codes 1, 2, and 9], and one was IS1245 negative and contained a code 15 *hsp65* sequevar [GenBank accession no. EU085419]). Seven *M. avium* isolates came from patients not infected with MAC, and five were IS1245 negative and contained a code 2 *hsp65* sequevar. The other two were IS1245 positive and showed different *hsp65* codes (1 and 2).

The three isolates from blood samples, two from the same patient, contained the IS1245 element and had the code 1 *hsp65* sequevar. The strain coming from a liver biopsy presented the IS1245 element and had a code 3 *hsp65* sequevar (Table 5). Finally, the isolate from the bone marrow sample was identified as *M. intracellulare*. All of the isolates cultured from sterile samples were causing disease.

Environmental isolates. All of the 17 isolates were identified as *M. avium*. The IS1245 element was absent in all of them. The sequencing of the *hsp65* 3' end revealed the same sequevar (code 2) in 16 strains (no signal was obtained in 1 strain).

IS1311 REA. In the 12 IS1245-negative *M. avium* isolates analyzed by means of the IS1311 PCR and subsequent digestion with HinfI and MseI, the expected fragments for the *M. avium* 285- and 323-bp bands and 419- and 189-bp bands, respectively, were obtained; thus, this confirmed the identification of the IS1245-negative isolates as *M. avium* strains.

Four IS1245-negative isolates were also subjected to 16S rDNA and ITS sequencing, and identical sequences were obtained for the four strains in both fragments. The 16S rDNA sequence from the four isolates showed one single-nucleotide polymorphism (T instead of G at nucleotide 445) with the *M. avium* 104 strain sequence (GenBank accession CP000479). The ITS sequence obtained matched perfectly with the Mav-A sequevar described previously (6, 12).

PFGE results. Thirty-eight isolates yielded readable patterns after digestion with the XbaI restriction enzyme: 29 from clinical samples (21 from urine samples, 6 from sputum samples, and 1 from a blood and a liver biopsy sample) (Table 3, Table 4, and Table 5) and 9 from environmental samples. Nine

unrelated patterns were observed. All of the environmental isolates, 19 out of 21 isolates from urine, and 3 out of 6 from sputum yielded identical (pattern A) or closely related (A*) patterns. All of these isolates also contained a code 2 *hsp65* sequevar and, with the exception of two isolates cultured from sputum samples, harbored no copies of IS1245. A second pattern (pattern B) was found in two isolates coming from sputum and urine samples from the same patient. The remaining isolates showed unrelated patterns.

DISCUSSION

This report describes the usefulness of several molecular techniques in the correct diagnosis and study of the epidemiology of MAC infections. Genetic tools, including commercial kits, for identification of MAC members are now available to mycobacteriology laboratories. Still, many clinical laboratories just identify the isolates as MAC members, as the treatment is the same for all MAC infections (4). Therefore, only incomplete epidemiological studies can be carried out. In our study, a combination of techniques was required to precisely identify the isolates to a subspecies level and to assess their relatedness.

IS1245 is considered to be highly specific to *M. avium* (13), so it is commonly used for identification and typing (40). However, *M. avium* strains lacking IS1245 were first described by Ritacco et al. (30) and were later reported as being isolated from human or animal sources (3, 19, 22); nonetheless, they were considered a rare finding and were always found in low proportions compared with the IS1245-positive strains. In most cases, characterization of IS1245-negative isolates is based only on commercial probes that might not identify the isolate unambiguously to the species-subspecies level. In our study, the identity of the *M. avium* strains lacking IS1245 was confirmed by 16S rDNA, ITS, and *hsp65* sequencing and by IS1311 REA and represented 81.8% of all *M. avium* isolates cultured, regardless of the source. The *hsp65* sequencing was a useful tool for confirmation of species identification of IS1245-negative *M. avium* isolates as previously described (4). Though PFGE and IS1245 RFLP had been shown to have similar discriminative powers, PFGE is the only applicable typing technique for these isolates.

Molecular tests demonstrated that the same *M. avium* strain lacking IS1245, with a code 2 *hsp65* sequevar and a certain PFGE profile, pattern A, was isolated from all environmental samples, most of the urine samples (21 out of 23, or 91.3%), and several respiratory specimens (5 out of 19, or 26.3%).

The clinical significance of the isolation of MAC members from nonsterile human samples is a controversial issue. In this

TABLE 5. Characterization of *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates cultured from sterile samples ($n = 4$) from three patients

Patient no.	Isolate reference	Sample	IS1245	<i>hsp65</i> sequevar	PFGE profile ^a	Infected with MAC ^b	Comment
37	MI06/00264	Liver biopsy	+	Code 3	Unrelated	Yes	HIV
39	MI05/03004	Blood	+	Code 1	Unrelated	Yes	HIV
19	MI06/00265 ^c	Blood	+	Code 1	NA	Yes	HIV
	MI06/03278 ^c	Blood	+	Code 1	NA	Yes	HIV

^a NA, not available.^b Based on clinical criteria.^c Patient with MAC isolates cultured from urine, sputum, and blood samples.

repetitive *M. avium* isolations in urine samples obtained using a catheter; the strain isolated presented a code 1 in the *hsp65* analysis, and its PFGE profile was considered unrelated to all the others obtained in the study.

Nineteen MAC isolates were cultured from sputum samples of 17 patients. Eight isolates were identified as *M. intracellulare*, seven of which were causing disease in immunocompetent patients, while one isolate could not be associated with any pathology. The remaining 11 isolates were identified as *M. avium* (Table 4), and four of these isolates were associated with disease in the patients (three of these isolates harbored IS1245 and contained different *hsp65* sequevars [codes 1, 2, and 9], and one was IS1245 negative and contained a code 15 *hsp65* sequevar [GenBank accession no. EU085419]). Seven *M. avium* isolates came from patients not infected with MAC, and five were IS1245 negative and contained a code 2 *hsp65* sequevar. The other two were IS1245 positive and showed different *hsp65* codes (1 and 2).

The three isolates from blood samples, two from the same patient, contained the IS1245 element and had the code 1 *hsp65* sequevar. The strain coming from a liver biopsy presented the IS1245 element and had a code 3 *hsp65* sequevar (Table 5). Finally, the isolate from the bone marrow sample was identified as *M. intracellulare*. All of the isolates cultured from sterile samples were causing disease.

Environmental isolates. All of the 17 isolates were identified as *M. avium*. The IS1245 element was absent in all of them. The sequencing of the *hsp65* 3' end revealed the same sequevar (code 2) in 16 strains (no signal was obtained in 1 strain).

IS1311 REA. In the 12 IS1245-negative *M. avium* isolates analyzed by means of the IS1311 PCR and subsequent digestion with HinfI and MseI, the expected fragments for the *M. avium* 285- and 323-bp bands and 419- and 189-bp bands, respectively, were obtained; thus, this confirmed the identification of the IS1245-negative isolates as *M. avium* strains.

Four IS1245-negative isolates were also subjected to 16S rDNA and ITS sequencing, and identical sequences were obtained for the four strains in both fragments. The 16S rDNA sequence from the four isolates showed one single-nucleotide polymorphism (T instead of G at nucleotide 445) with the *M. avium* 104 strain sequence (GenBank accession CP000479). The ITS sequence obtained matched perfectly with the *M. avium* sequevar described previously (6, 12).

PFGE results. Thirty-eight isolates yielded readable patterns after digestion with the XbaI restriction enzyme: 29 from clinical samples (21 from urine samples, 6 from sputum samples, and 1 from a blood and a liver biopsy sample) (Table 3, Table 4, and Table 5) and 9 from environmental samples. Nine

unrelated patterns were observed. All of the environmental isolates, 19 out of 21 isolates from urine, and 3 out of 6 from sputum yielded identical (pattern A) or closely related (A*) patterns. All of these isolates also contained a code 2 *hsp65* sequevar and, with the exception of two isolates cultured from sputum samples, harbored no copies of IS1245. A second pattern (pattern B) was found in two isolates coming from sputum and urine samples from the same patient. The remaining isolates showed unrelated patterns.

DISCUSSION

This report describes the usefulness of several molecular techniques in the correct diagnosis and study of the epidemiology of MAC infections. Genetic tools, including commercial kits, for identification of MAC members are now available to mycobacteriology laboratories. Still, many clinical laboratories just identify the isolates as MAC members, as the treatment is the same for all MAC infections (4). Therefore, only incomplete epidemiological studies can be carried out. In our study, a combination of techniques was required to precisely identify the isolates to a subspecies level and to assess their relatedness.

IS1245 is considered to be highly specific to *M. avium* (13), so it is commonly used for identification and typing (40). However, *M. avium* strains lacking IS1245 were first described by Ritacco et al. (30) and were later reported as being isolated from human or animal sources (3, 19, 22); nonetheless, they were considered a rare finding and were always found in low proportions compared with the IS1245-positive strains. In most cases, characterization of IS1245-negative isolates is based only on commercial probes that might not identify the isolate unambiguously to the species-subspecies level. In our study, the identity of the *M. avium* strains lacking IS1245 was confirmed by 16S rDNA, ITS, and *hsp65* sequencing and by IS1311 REA and represented 81.8% of all *M. avium* isolates cultured, regardless of the source. The *hsp65* sequencing was a useful tool for confirmation of species identification of IS1245-negative *M. avium* isolates as previously described (4). Though PFGE and IS1245 RFLP had been shown to have similar discriminative powers, PFGE is the only applicable typing technique for these isolates.

Molecular tests demonstrated that the same *M. avium* strain lacking IS1245, with a code 2 *hsp65* sequevar and a certain PFGE profile, pattern A, was isolated from all environmental samples, most of the urine samples (21 out of 23, or 91.3%), and several respiratory specimens (5 out of 19, or 26.3%).

The clinical significance of the isolation of MAC members from nonsterile human samples is a controversial issue. In this

way, MAC-positive culture has been shown to occur in respiratory specimens from patients without clinical disease (38); this could happen due to contamination of the sample or transient or persistent colonization. Likewise, results of direct observation of mycobacteria by acid-fast staining in urine samples should be interpreted carefully.

The molecular characterization correlated with clinical significance in that the 18 patients in whose urine the IS1245-negative code 2 *hsp65* sequevar was found were considered not infected by MAC by clinical criteria. On the other hand, the two *M. avium* isolates cultured from urine samples that harbored IS1245 and had a code 1 *hsp65* sequevar came from two patients likely to have an *M. avium* infection: the first patient was thought to have a disseminated infection, and the second had a history of repetitive *M. avium* isolations in urine.

The explanation of the IS1245-negative code 2 *hsp65* sequevar isolations from certain urine samples could be attributed to the collection method: in this hospital, patients collect their urine samples into sterile receptacles, but intermediate containers might be used when the patient is handicapped. These intermediate containers are washed with tap water and soap after every use but not always sterilized while used by the same patient. The environmental isolates were cultured from the sediment obtained from the intermediate containers or from the taps of the patient's rooms. Thus, it is likely that urine samples collected using these containers would be contaminated by the environmental MAC strains. MAC members have been shown to grow in biofilms, increasing their resistance to disinfection methods such as chlorination (33); the most prevalent strain found in our study might persistently colonize the water supply system of the hospital as it was isolated from water samples from different floors of the hospital during a 3-year period.

The possibility of contamination of urine samples during the collecting process in the hospital is enhanced by the fact that, in samples collected in patient's houses, the recovery rate of *M. avium* is lower. In this context, in the period 1996 to 2003, 3,195 urine samples from admitted patients were cultured for the presence of mycobacteria, and 79 (2.47%) were positive. In the same period, 3,486 samples from outpatients were also collected and analyzed, and only 4 (0.11%) yielded positive isolation of MAC (E. Gomez-Mampaso, unpublished data).

Unlike the urine sample results, in the sputum samples the IS1245-negative code 2 *hsp65* sequevar strain represented only 5 out of the 19 MAC isolates recovered (again, they were considered as nonpathogenic). Sputum samples are collected directly into sterile receptacles, and therefore contamination of these samples is unlikely to occur; however, patients can be exposed to aerosols from shower and tap water from the bathrooms. If the water harbors *M. avium*, it could be a possible source of contamination.

Regarding *M. intracellulare*, eight isolates were recovered from respiratory samples and one from bone marrow. All except one (isolated from sputum) were found to be disease causing, highlighting the importance of this bacteria as a human pathogen.

Hospital water has been reported as a possible source of MAC infection (1, 38, 41). In these studies some degree of relationship was found between environmental *M. avium* and strains isolated from clinical samples (sputum, blood, or bone

marrow). However, tap water was not usually added during the collection of the samples from which the cultures were recovered, and therefore contamination with environmental *M. avium* strains was considered unlikely. In our setting, we consider more possible a contamination of certain samples due to an incorrect collection method in some special cases of disabled patients. This hypothesis is supported by the fact that most of the patients (15 out of 20, or 75%) with positive isolations of MAC in urine were immunocompetent and were considered afterwards uninfected by MAC based on further medical analysis. Therefore, the environmental strain seemed to have low virulence since, even though it was widely distributed, it was not found to be pathogenic in any patient. However, the risk of infection by this strain cannot be ruled out, particularly in the case of HIV patients. To our knowledge, there are no studies that correlate the absence of IS1245, the *hsp65* sequevar, the PFGE pattern, and virulence, and therefore further research is needed to find out if these results can be extrapolated to other settings.

In summary, these results highlight the possibility of false-positive acid-fast staining or isolations of MAC members in nonsterile clinical samples, especially in the case of urine specimens. Therefore, it is important to characterize the environmental mycobacteria present in the facilities in order to exclude false-positive isolation in samples susceptible to contamination. For this purpose a combination of molecular techniques is required to correctly characterize MAC isolates. In our study we have demonstrated the presence of a particular strain persistently colonizing the water supply system and representing a potential source of contamination of samples and of infection in patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by project AGL2005-07792 of the Spanish Ministry of Science and Technology and European Commission QLRT-2000-01420. J.A. was the recipient of a grant (AP2002-0141) of the Ministry of Education and Culture.

We thank the staff of the SADNA (C.I.B. Madrid) for sequencing. We are grateful to Matthew Gilmour for careful revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Aronson, T., A. Holtzman, N. Glover, M. Boian, S. Froman, O. G. Berlin, H. Hill, and G. Stelma, Jr. 1999. Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 37:1008–1012.
2. Bartos, M., P. Hložek, P. Svastova, L. Dvorska, T. Bull, L. Matlova, I. Parmova, I. Kuhn, J. Stubbs, M. Moravkova, J. Kintr, V. Beran, I. Melicharek, M. Oceppek, and I. Pavlik. 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J. Microbiol. Methods* 64:333–345.
3. Bauer, J., A. B. Andersen, D. Askgaard, S. B. Giese, and B. Larsen. 1999. Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2-year period in Denmark by using IS1245. *J. Clin. Microbiol.* 37:600–605.
4. Beggs, M. L., R. Stevanova, and K. D. Eisenach. 2000. Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J. Clin. Microbiol.* 38:508–512.
5. Boddington, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker, and E. C. Bottger. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28:1751–1759.
6. De Smet, K. A., I. N. Brown, M. Yates, and J. Ivanyi. 1995. Ribosomal internal transcribed spacer sequences are identical among *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from AIDS patients, but vary among isolates from elderly pulmonary disease patients. *Microbiology* 141:2739–2747.
7. Dvorska, L., T. J. Bull, M. Bartos, L. Matlova, P. Svastova, R. T. Weston, J. Kintr, I. Parmova, D. van Soelingen, and I. Pavlik. 2003. A standardised

- restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Methods* 55:11–27.
8. Falkinham, J. O., III. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177–215.
 9. Feller, M., K. Huwiler, R. Stephan, E. Altpeter, A. Shang, H. Furrer, G. E. Pfyffer, T. Jemmi, A. Baumgartner, and M. Egger. 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7:607–613.
 10. Field, S. K., D. Fisher, and R. L. Cowie. 2004. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* 126:566–581.
 11. Fischer, O., L. Matlova, J. Bartl, L. Dvorska, I. Melicharek, and I. Pavlik. 2000. Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol. (Praha)* 45:147–152.
 12. Frothingham, R., and K. H. Wilson. 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 175:2818–2825.
 13. Guerrero, C., C. Bernasconi, D. Burki, T. Bodmer, and A. Telenti. 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 33:304–307.
 14. Hazra, R., S. H. Lee, J. N. Maslow, and R. N. Hesson. 2000. Related strains of *Mycobacterium avium* cause disease in children with AIDS and in children with lymphadenitis. *J. Infect. Dis.* 181:1298–1303.
 15. Ichijima, S., K. Shimokata, and M. Tsukamura. 1988. The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. *Microbiol. Immunol.* 32:733–739.
 16. Inderlied, C. B., C. A. Kemper, and L. E. Bermudez. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:266–310.
 17. Johansen, T. B., B. Djonje, M. R. Jensen, and I. Olsen. 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *J. Clin. Microbiol.* 43:2500–2502.
 18. Kent, P. T., and G. P. Kubica. 1989. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
 19. Komijn, R. E., P. E. de Haas, M. M. Schneider, T. Eger, J. H. Nieuwenhuijs, R. J. van den Hoek, D. Bakker, F. G. Zijl Ervel, and D. van Soolingen. 1999. Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:1254–1259.
 20. Kunze, Z. M., F. Portaels, and J. J. McFadden. 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J. Clin. Microbiol.* 30:2366–2372.
 21. Kunze, Z. M., S. Wall, R. Appelberg, M. T. Silva, F. Portaels, and J. J. McFadden. 1991. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 5:2265–2272.
 22. Legrand, E., C. Sola, B. Verdol, and N. Rastogi. 2000. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* recovered from AIDS patients in the Caribbean as studied by a consensus IS1245-RFLP method and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 151:271–283.
 23. Marsh, I., R. Whittington, and D. Cousins. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell Probes* 13:115–126.
 24. Mazurek, G. H., S. Hartman, Y. Zhang, B. A. Brown, J. S. Hector, D. Murphy, and R. J. Wallace, Jr. 1993. Large DNA restriction fragment polymorphism in the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex: a potential epidemiologic tool. *J. Clin. Microbiol.* 31:390–394.
 25. Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, L. T. Van der, L. Rigouts, F. Portaels, and D. van Soolingen. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and "*M. avium* subsp. *hominissuis*" for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1505–1518.
 26. Novi, C., L. Rindi, N. Lari, and C. Garzelli. 2000. Molecular typing of *Mycobacterium avium* isolates by sequencing of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer and comparison with IS1245-based fingerprinting. *J. Med. Microbiol.* 49:1091–1095.
 27. Pavlik, I., P. Svastova, J. Bartl, L. Dvorska, and I. Rychlik. 2000. Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:212–217.
 28. Primm, T. P., C. A. Lucero, and J. O. Falkinham III. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:98–106.
 29. Ringuet, H., C. Akoua-Koffi, S. Honore, A. Varnerot, V. Vincent, P. Berche, J. L. Gaillard, and C. Pierre-Audigier. 1999. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37:852–857.
 30. Ritacco, V., K. Kremer, L. T. Van der, J. E. Pijnenburg, P. E. de Haas, and D. van Soolingen. 1998. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2:242–251.
 31. Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig, and H. Mauch. 1998. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 36:139–147.
 32. Runyon, E. H. 1967. *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95:861–865.
 33. Steed, K. A., and J. O. Falkinham, III. 2006. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4007–4011.
 34. Tacquet, A., and F. Tison. 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium. *Ann. de l'Institut Pasteur.* 100:676–680. (In French.)
 35. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175–178.
 36. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
 37. Thorel, M. F., M. Krichevsky, and V. V. Levy-Frebault. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:254–260.
 38. Tobin-D'Angelo, M. J., M. A. Blass, C. del Rio, J. S. Halvosa, H. M. Blumberg, and C. R. Horsburgh, Jr. 2004. Hospital water as a source of *Mycobacterium avium* complex isolates in respiratory specimens. *J. Infect. Dis.* 189:98–104.
 39. Turenne, C. Y., M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins, and M. A. Behr. 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 44:433–440.
 40. van Soolingen, D., J. Bauer, V. Ritacco, S. C. Leao, I. Pavlik, V. Vincent, N. Rastogi, A. Gori, T. Bodmer, C. Garzelli, and M. J. Garcia. 1998. IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J. Clin. Microbiol.* 36:3051–3054.
 41. von Reyn, C. F., J. N. Maslow, T. W. Barber, J. O. Falkinham, III, and R. D. Arbeit. 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343:1137–1141.
 42. Wayne, L. G., R. C. Good, A. Tsang, R. Butler, D. Dawson, D. Groothuis, W. Gross, J. Hawkins, J. Kilburn, M. Kubin, et al. 1993. Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:482–489.
 43. Wilton, S., and D. Cousins. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1:269–273.

DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral recoge varias investigaciones diseñadas con el fin de clarificar algunos aspectos poco estudiados con anterioridad relativos al complejo *avium* en aislados de nuestro país. Como ya se ha revisado, el complejo *avium* comprende dos especies con grandes diferencias entre ellas, *M. intracellulare* y *M. avium*; esta última está subdividida en cuatro subespecies distinguibles por sus diferentes características fenotípicas y genotípicas. A pesar de esta diversidad, en muchos estudios aún no se realiza una clara diferenciación entre algunas de las subespecies (principalmente *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *hominissuis*), siendo *Map* la excepción. El avance producido en los últimos años en el campo de la biología molecular ha llevado consigo la aparición y desarrollo de nuevas técnicas de tipificación molecular, dirigidas al estudio del ADN bacteriano, que hacen cada vez más asequible la caracterización completa de un aislado. En los trabajos que componen esta tesis se ha hecho hincapié en la utilización de estas técnicas junto a otras más tradicionales (estudio de características fenotípicas, detección de la respuesta inmune del hospedador) para avanzar en el conocimiento de las bacterias comprendidas en MAC.

Una clasificación un tanto simplificadora de las especies incluidas en MAC podría dividir las en las que se comportan como patógenos estrictos, siendo aisladas normalmente de hospedadores infectados y en mucha menor medida del ambiente (*M. avium* subsp. *avium* y

Map) y las que pueden actuar como organismos saprofitos, aunque en determinadas circunstancias (fundamentalmente hospedadores inmunosuprimidos) puedan dar lugar a cuadros clínicos graves por su condición de patógenos oportunistas (*M. intracellulare* y *M. avium* subsp. *hominissuis*). Dentro del primer grupo, la enfermedad que más atención ha suscitado debido a su fuerte impacto económico en la producción animal (y a sus aún discutidas vinculaciones con enfermedades de Salud Pública) es la paratuberculosis.

A pesar de haber sido descrito hace ya más de cien años, el bacilo causante de esta patología continúa generando interrogantes sobre su distribución, características diferenciales, patogenia, etc. Uno de los descubrimientos recientes más destacables fue su capacidad de infectar un amplio espectro de hospedadores, mucho más allá de las especies rumiantes en las que era bien conocido. La detección de infecciones por *Map* en numerosas especies no rumiantes (Beard *et al.*, 2001a; Corn *et al.*, 2005), además de su ya conocida presencia en rumiantes de vida salvaje (Manning y Collins, 2001) trajo consigo la hipótesis de que todas ellas pudieran actuar como potenciales reservorios de la enfermedad, al igual que sucede en algunos países con la tuberculosis bovina [tejones (*Meles meles*) en Reino Unido (Reynolds, 2006), zarigüeyas (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda (Ryan *et al.*, 2006), jabalíes (*Sus scrofa*) y en menor medida ciervos (*Cervus elaphus*) en España (Aranaz *et al.*, 2004; Gortázar *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2006; Hermoso de Mendoza J. *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2008)], suponiendo un serio problema para los planes de erradicación de la enfermedad. Esta hipótesis ha sido demostrada en el caso de los conejos (*Oryctolagus cuniculus*) en Escocia (Daniels *et al.*, 2003a) mediante diversos estudios de campo que prueban su implicación en el mantenimiento de la infección, manifestando el potencial papel que algunas especies de vida salvaje pueden llegar a alcanzar.

Sin embargo en España, donde la paratuberculosis está extendida en las tres especies de rumiantes domésticos, no existían apenas datos sobre la posible distribución de *Map* en las especies de vida salvaje. El riesgo potencial de estas especies como fuentes de infección se ve incrementado en el caso de explotaciones de extensivo, donde los animales de abasto pueden estar en contacto estrecho con animales salvajes y peridomésticos, y en parques naturales, donde la enfermedad podría extenderse, convirtiéndose en un foco de transmisión para explotaciones vecinas. En el único estudio publicado sobre este tema al inicio de esta tesis doctoral se diagnosticó la enfermedad en una población de gamos (*Dama dama*) situada en la reserva regional de caza de El Sueve (Asturias) (Marco *et al.*, 2002). La presencia de rumiantes

domésticos con paratuberculosis en la zona fue apuntada como una posible fuente de la infección para la población de gamos.

Dado que estos resultados y los publicados por grupos en otros países indicaron que la paratuberculosis podía estar presente en especies no domésticas, realizamos un muestreo en animales de vida salvaje y peridomésticos para determinar la prevalencia en poblaciones españolas. El método de diagnóstico elegido fue el cultivo bacteriológico, por considerar que es el único método que puede diagnosticar con total seguridad la infección y la presencia de micobacterias viables en los animales muestreados. En total se muestrearon 455 animales (118 aves y 337 mamíferos), procedentes de las Comunidades Autónomas de Madrid, Castilla La Mancha, Andalucía y Comunidad Valenciana (Álvarez *et al.*, 2006).

La baja prevalencia de paratuberculosis observada mediante cultivo en las especies muestreadas parece indicar que la tasa de infección en estos animales es baja. Las áreas del estudio se seleccionaron teniendo en cuenta la presencia de explotaciones donde la enfermedad estuviera presente en los alrededores, y se incluyeron en el estudio especies que pudieran entrar en contacto de forma directa o indirecta (a través de fómites) con especies rumiantes domésticas y por tanto constituir una fuente de infección para las mismas. A pesar de todo ello, sólo se aisló *Map* a partir de un jabalí y un gamo. Ambas cepas fueron aisladas de animales procedentes del Parque Nacional de Doñana, uno de los espacios protegidos más importantes del territorio español y una de las mayores reservas ecológicas de Europa. La presencia de cepas de tipo III, de muy difícil aislamiento (de Juan *et al.*, 2006b), en los rumiantes domésticos de varias de las áreas muestreadas podría implicar una cierta subestimación de la prevalencia real, a causa de la menor sensibilidad del cultivo para estas cepas. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que durante parte del estudio no se incluyeron los medios más idóneos para el crecimiento *in vitro* de este tipo de *Map* (de Juan *et al.*, 2006b).

En lo que hace referencia al jabalí, la baja prevalencia observada [1,54%, 0,04-8,28 para un intervalo de confianza (I.C.) de 95%] está en consonancia con lo descrito en diversos estudios de cultivo en otras especies monogástricas de vida salvaje (Beard *et al.*, 2001a; Corn *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2007). De hecho, los aislamientos de *Map* a partir de muestras de jabalí son un hallazgo muy poco frecuente, habiéndose descrito en pocas ocasiones (Machackova *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005; Sevilla *et al.*, 2007). Sin embargo la importancia de encontrar individuos infectados, aunque sea en un número pequeño, no debe soslayarse, ya que pueden diseminar la infección en un área considerable, dada su capacidad para recorrer grandes distancias, sus hábitos en ocasiones carroñeros y su población creciente en ciertas áreas de España (Vicente *et*

al., 2007). La ausencia de lesiones macroscópicas en todas las muestras analizadas podría indicar que, además, estos animales no sufren un proceso clínico debido a la infección por *Map*. Por otra parte, el hecho de haber cultivado la micobacteria a partir de muestras de tejido y no de heces permite asegurar por una parte que el animal estaba efectivamente infectado (y no era un simple portador); sin embargo, por otra parte impide asegurar si el individuo infectado estaba excretando la micobacteria y por tanto contaminando el medio ambiente.

En lo referente a las muestras de cérvidos analizadas, tan solo se aisló *Map* a partir de un gamo (prevalencia de 1,06%, 0,027-5,785, I.C. de 95%). Un trabajo realizado en ciervos, gamos, corzos y muflones de la República Checa usando el cultivo bacteriológico describió una prevalencia similar del 5,3% (Machackova *et al.*, 2004). Sin embargo, estos resultados contrastan con los publicados recientemente en un estudio sobre prevalencias de paratuberculosis en ciervo (*Cervus elaphus*) en España mediante un ELISA de detección de anticuerpos frente a *Map* (Reyes-García *et al.*, 2008). En dicho trabajo se muestrearon animales de varias localizaciones geográficas, observando una seroprevalencia total de 30,16%, muy por encima de lo descrito en otros estudios similares en cérvidos de vida salvaje utilizando métodos de ELISA (Shulaw *et al.*, 1986; Quist *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2004; Tryland *et al.*, 2004). El lugar de procedencia de la muestra y la presencia de ganado en la zona se revelaron como posibles factores de riesgo, pero sorprendentemente las poblaciones de vida libre mostraron mayores títulos de anticuerpos que los ciervos en granjas (que tenían un mayor nivel de exposición a poblaciones de rumiantes domésticos). La falta de confirmación de la infección por *Map* mediante cultivo no permite, por otra parte, concluir con seguridad que los animales seropositivos fueran debidos en su totalidad a la paratuberculosis, ya que ciertas micobacterias ambientales pueden provocar la aparición de falsos positivos (Tryland *et al.*, 2004). No obstante, nueve individuos con infecciones por otras micobacterias dieron resultados negativos en el ELISA, lo que podría indicar que la tasa de reactividad cruzada no fue elevada, y la prevalencia de paratuberculosis en ciervos pudiera ser mayor por tanto en España que en otros países (Reyes-García *et al.*, 2008). De cualquier forma, queda establecida la existencia de infecciones por *Map* en poblaciones de vida silvestre rumiantes y no rumiantes, lo que puede tener importantes implicaciones epidemiológicas. Además, la presencia del microorganismo en un Parque Nacional como es Doñana, donde existen poblaciones de especies en peligro de extinción con un gran valor ecológico resalta la potencial relevancia que puede adquirir la enfermedad en este entorno.

Como ha quedado descrito, el avance logrado en las últimas décadas en el campo de la biología molecular ha permitido la diferenciación de varios subgrupos dentro de *Map* basándose

en diferencias genotípicas (que concordaban con diferencias fenotípicas observadas anteriormente). La tradicional agrupación de los aislados de *Map* en cepas de bovino y cepas de ovino, basándose en datos epidemiológicos de transmisión interespecífica y en la diferente tasa de crecimiento *in vitro*, fue confirmada mediante la observación de diferencias en su ADN por primera vez en 1990 (Collins *et al.*, 1990a). Collins y colaboradores especularon en este estudio con una posible adaptación al hospedador. Desde entonces varios trabajos han hecho referencia a una cierta preferencia de hospedador en los tipos de cepas de *Map*, de modo que las cepas de tipo I (y de tipo III) se aislaban preferentemente a partir de ovino, mientras que los aislados de tipo II podían provenir de un rango de especies más amplio (incluyendo bovinos) (Marsh *et al.*, 1999; Cousins *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2002). Aunque existen referencias de aislamientos de cepas de tipo I en bovino, en algunos casos la fuente de infección se atribuyó a un contacto (directo o indirecto) con ovejas con paratuberculosis, sin que existieran evidencias de una infección endémica en bovinos por dichas cepas (Whittington *et al.*, 2001b). Otros trabajos hacen referencia a la falta de transmisión de la enfermedad desde ovino a bovino, lo que condujo a la creencia de que, mientras que las ovejas podían infectarse por cepas de todos los tipos, los bovinos eran más resistentes a las cepas ovinas (Whittington *et al.*, 2000b). Basándose en esa idea se han mantenido prácticas de manejo que comportan un cierto riesgo, como el pastoreo de vacas en zonas donde se han eliminado rebaños de ovino infectados con paratuberculosis en Australia (Marsh *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 2000b).

Sin embargo, trabajos realizados en otras localizaciones describen situaciones diferentes: en Europa, donde la paratuberculosis es endémica, las cepas de tipo II son las aisladas con mayor frecuencia, también a partir de ovinos y otros pequeños rumiantes y especies salvajes (Pavlik *et al.*, 2000a; Stevenson *et al.*, 2002; Djonje *et al.*, 2005). Por ello se planteó el estudio sobre los tipos de cepas de *Map* presentes en España, con el fin de determinar si existía una asociación con las especies hospedadoras en nuestro ecosistema. Dados los problemas ya descritos, inherentes a la realización de técnicas de PFGE y RFLP con aislados de tipo I y III debido a su lenta velocidad de crecimiento, las cepas fueron clasificadas mediante PCR en aislados de tipo I/III o de tipo II siguiendo la metodología descrita por varios autores (Marsh *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2002; Dohmann *et al.*, 2003). Aunque, de acuerdo con los trabajos mencionados anteriormente, los aislados de tipo II fueron más numerosos, la tasa de cultivos pertenecientes al tipo I/III fue inusualmente alta, destacando el número de aislados a partir de muestras de bovino y caprino. Los estudios epidemiológicos realizados no pudieron demostrar contactos entre los bovinos infectados con cepas de tipo I/III y otros pequeños rumiantes con paratuberculosis, lo que parece indicar que estas especies no son la única posible

fuente de infección. Especialmente interesante fue el hecho de que, mientras las cepas de tipo II fueron aisladas mayoritariamente de ganado de importación, los aislados de tipo I/III fueron cultivados a partir de muestras de razas de ganado autóctonas, lo que permite especular sobre una posible susceptibilidad asociada a la raza hospedadora o la existencia de infecciones muy antiguas en estas especies por un tipo de *Map* poco frecuente en el resto de Europa. Estas hipótesis han sido posteriormente reforzadas con los datos derivados de otros trabajos realizados en España mediante PFGE, informando de elevadas prevalencias de cepas de tipo ovino en cabras y de cepas con perfiles inusuales en ganado bovino autóctono de lidia (Sevilla *et al.*, 2005; de Juan *et al.*, 2006b; Sevilla *et al.*, 2007; Sevilla, 2007). Estos datos subrayan la inconveniencia del uso de la nomenclatura de cepas “ovinas” o “bovinas”, ya que los datos anteriormente expuestos resaltan la existencia de aislados “ovinos” (o tipo I/III) a partir de muestras bovinas, o aislados “bovinos” a partir de ovejas; por ello, si bien puede haber una cierta preferencia de especie (especialmente en algunos lugares del mundo, como Australia), parece claro que otros factores epidemiológicos además de la especie hospedadora resultan claves a la hora de explicar la distribución de los distintos tipos.

El estudio de las diferencias encontradas entre los distintos tipos de aislados de *Map* resulta de vital importancia para establecer hipótesis acerca de la evolución de esta especie bacteriana, así como para explicar sus diferentes fenotipos y su controvertida preferencia por una especie hospedadora (Dohmann *et al.*, 2003). Mediante las técnicas de RFLP (Pavlik *et al.*, 1999) y PFGE (Stevenson *et al.*, 2002; de Juan *et al.*, 2005) se han establecido dos grupos mayoritarios (I y II), con un grupo (III o intermedio), representado por cepas aisladas con menor frecuencia, entre ambos (Collins *et al.*, 1990a; de Lisle *et al.*, 1992). Las diferencias entre los dos grupos mayoritarios, I y II, se han visto reflejadas también al aplicar técnicas de genómica comparativa (Dohmann *et al.*, 2003; Marsh y Whittington, 2005; Semret *et al.*, 2006c) y al estudiar las secuencias de ciertos genes (Turenne *et al.*, 2006; Marsh y Whittington, 2007) y secuencias de inserción (Semret *et al.*, 2006b).

En lo que hace referencia a los aislados de tipo III, los perfiles obtenidos al aplicar RFLP y PFGE se asemejan más a los observados en aislados de tipo I, lo que podría indicar una mayor proximidad genética a éstos últimos. Los resultados obtenidos al emplear técnicas de caracterización molecular basadas en PCR corroboran esta hipótesis, ya que tanto la PCR-REA dirigida al elemento IS1311 (Marsh *et al.*, 1999) como la PCR descrita por Collins y colaboradores (Collins *et al.*, 2002) no pueden diferenciar entre ambos tipos. Sin embargo ambas técnicas detectan diferencias puntuales en el ADN. Para determinar si existían diferencias a nivel de LSPs

en las cepas del tipo III, que podrían implicar cambios más relevantes en aspectos de su fenotipo como la patogenicidad o la preferencia por un hospedador, se realizó el siguiente estudio incluido en el capítulo segundo. La atención se centró sobre los LSPs anteriormente descritos como capaces de diferenciar entre los tipos I y II (Semret *et al.*, 2006c), complementándose el estudio con la secuenciación del gen *hsp65*. Los resultados obtenidos coinciden con las técnicas de PCR citadas anteriormente, ya que todos los aislados de tipo III analizados presentaron la misma distribución de LSPs y secuencia de *hsp65* que la descrita para cepas del tipo I, haciendo imposible la diferenciación entre estos tipos mediante estas técnicas. Todo ello parece indicar una menor variabilidad entre los tipos I y III comparados con el tipo II, lo que ha llevado a algunos autores a integrarlos como un único grupo (Collins *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2007). Posteriores estudios sí han encontrado polimorfismos capaces de diferenciar entre los tipos I y III localizados en los genes *gyrA* y *gyrB* (Castellanos *et al.*, 2007), demostrando la independencia de este tercer tipo.

La importancia de la paratuberculosis en los rumiantes domésticos trasciende sus consecuencias directas (pérdida de productividad y restricciones en el comercio), ya que su proximidad genética con los agentes causales de la tuberculosis en estas especies (*M. bovis* y, en menor medida, *M. caprae*) puede dar lugar a importantes problemas diagnósticos. Como ya ha quedado descrito, el diagnóstico de la tuberculosis está basado fundamentalmente en la medición de la respuesta del animal (*in vivo* o *in vitro*) a un derivado purificado proteico (PPD) elaborado a partir de una cepa de *M. bovis*. Sin embargo, como se ha mencionado, algunas de las proteínas contenidas en esta PPD bovina no son específicas del complejo *M. tuberculosis*, sino que se encuentran en otras micobacterias, entre ellas miembros de MAC, por lo que pueden aparecer falsas reacciones. Los problemas originados por estas reacciones cruzadas pueden dividirse en aquellos que afectan a la especificidad y los que comprometen la sensibilidad. Las primeras son de gran importancia en aquellas situaciones en las que no hay tuberculosis y han sido estudiadas en profundidad, ya sea en casos de infecciones-sensibilizaciones naturales (Lauzi *et al.*, 2000; Walravens *et al.*, 2002; Cagiola *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2005) o por vacunaciones frente a *Map* (Kohler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002; Buddle *et al.*, 2003). Incrementar la especificidad del test cutáneo es el motivo fundamental de comparar la respuesta a la PPD bovina a la obtenida mediante la estimulación con una PPD aviar (IDTB comparada), para diferenciar la respuesta debida a la sensibilización con otras micobacterias no tuberculosas, como ya se ha descrito en la revisión bibliográfica.

Sin embargo los problemas causados por infecciones naturales de paratuberculosis (u otras micobacterias del complejo *avium*) en la detección de animales enfermos (sensibilidad) han sido objeto de menos estudios. Estos problemas son de vital importancia en países donde la tuberculosis aún está presente y se están llevando a cabo programas de erradicación destinados a la detección y eliminación de todos los animales infectados por *M. bovis*/*M. caprae* (como España). El primer trabajo incluido en el capítulo tercero, realizado en un rebaño de cabras con una doble infección natural por tuberculosis y paratuberculosis, demostró el gran impacto que la segunda enfermedad puede tener en la sensibilidad de las pruebas diagnósticas aplicadas para la erradicación de la primera. La tuberculosis caprina es una enfermedad de gran importancia debido a sus graves consecuencias económicas y a su potencial zoonótico, pero además puede comprometer el éxito de las campañas de erradicación de tuberculosis bovina llevadas a cabo en numerosos países, ya que puede actuar como reservorio para esta especie. En este estudio, el test más afectado fue la IDTB comparada, cuya sensibilidad cayó por debajo del 50% en el conjunto del rebaño. Este hecho resulta de gran importancia, pues el uso de esta técnica se recomienda en principio en situaciones donde se espera un alto porcentaje de reactores aviáres (como puede suceder en rebaños infectados con paratuberculosis) (Monaghan *et al.*, 1994). Para maximizar el número de animales infectados detectados, en la especie caprina la IDTB comparada no debería aplicarse en áreas (o rebaños) donde la tuberculosis y la paratuberculosis coexistan, ya que resultaría imposible llegar a sanear una explotación basándose sólo en esta estrategia diagnóstica.

Pero el impacto de la paratuberculosis en las pruebas realizadas para la detección de cabras con tuberculosis no se limitó al posible efecto de enmascaramiento en la IDTB de comparación como consecuencia de la reacción a la PPD aviar. La IDTB simple también demostró una sensibilidad por debajo de lo esperado, y su menor fiabilidad se concentró en los animales con una doble infección, lo que también resalta el posible efecto de la paratuberculosis sobre esta prueba. En el rebaño objeto de este estudio, el test de detección de IFN- γ , aunque proporcionó una sensibilidad algo menor de lo descrito anteriormente (Liébana *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1998), pareció menos afectado; es de destacar como la aplicación combinada de ambas técnicas (test de IFN- γ y IDTB simple) proporcionó una elevada sensibilidad. La conclusión de mayor relevancia que puede extraerse de este trabajo es la importancia de la determinación del estatus de un rebaño respecto a la tuberculosis y a la paratuberculosis antes de decidir una estrategia diagnóstica, dado el gran impacto ejercido por esta última. Si el objetivo es la erradicación de la tuberculosis caprina de un rebaño/área parece evidente la inconveniencia de aplicar pruebas de comparación, dada la baja sensibilidad que puede esperarse de las mismas.

Sin embargo conviene tener en cuenta el inevitable descenso en la especificidad de las técnicas diagnósticas derivado de la aplicación de una estrategia lo más sensible posible. Por ello se hace necesaria una evaluación individual de cada situación con el fin de clarificar cuál es el objetivo principal (detección de animales infectados *versus* correcta clasificación de animales sanos) y actuar en consecuencia, pero siempre valorando el demostrado efecto de la paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la especie caprina, se planteó un estudio para evaluar el impacto de la paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis en ganado vacuno. La prueba elegida en primer lugar fue el test de detección de IFN- γ , por ser una técnica de interpretación objetiva y por lo tanto menos sujeta a posibles variaciones debidas a una incorrecta realización de la prueba. En el rebaño elegido para este trabajo se había confirmado también una doble infección por tuberculosis y paratuberculosis, y todos los animales incluidos para evaluar la sensibilidad aparente de la prueba de IFN- γ fueron muestreados tras su sacrificio para el cultivo bacteriológico de *M. bovis* y *Map*. El efecto de la paratuberculosis volvió a quedar patente, ya que la probabilidad de que un animal infectado por *M. bovis* fuera detectado se vio afectada de forma determinante por una infección concomitante por *Map*. De hecho, al aplicar la prueba de IDTB comparativa y el test de detección de IFN- γ en paralelo, se detectaron todos los animales tuberculosos con un cultivo negativo de *Map*, mientras que tan solo el 50% de las vacas con una doble infección fueron positivas a alguna de las dos pruebas.

En este rebaño se evaluó también la sensibilidad aparente de un ELISA de detección de anticuerpos frente a *Map*. El ELISA es el método de diagnóstico más utilizado (junto con el cultivo fecal) para el diagnóstico de la paratuberculosis *in vivo*, aunque su sensibilidad experimenta grandes variaciones en función de la fase de infección en la que se halle el animal analizado (Nielsen y Toft, 2008). Otro inconveniente es la incapacidad de la mayoría de ELISAs comerciales de discriminar entre los anticuerpos producidos en la infección producida por *M. bovis* o por *Map* (Olsen *et al.*, 2001a; Lilenbaum *et al.*, 2007). La simple realización de la prueba de IDTB puede generar respuestas inmunes capaces de provocar falsos positivos en un ELISA de detección de anticuerpos frente a *Map* (Vargés *et al.*, 2007). A pesar de ello, en nuestro estudio la sensibilidad del ELISA en los animales con una doble infección tuberculosis-paratuberculosis fue menor que en los animales infectados sólo por *Map*; estos resultados son lo contrario de lo que podría suponerse, ya que en el caso de los animales doblemente infectados cabría esperar

una mayor respuesta humoral frente a cualquiera de las dos micobacterias que, presumiblemente, sería detectada en el ELISA de *Map*.

El estudio detallado de los animales con una doble infección en este rebaño revela que, en lo que respecta a los resultados al test de IFN- γ y al ELISA de paratuberculosis, la mayoría de los animales que son positivos a una prueba son negativos a la otra, y viceversa. La relación entre un resultado negativo en la prueba de IFN- γ y un resultado positivo al ELISA de *Map* en animales doblemente infectados también se observó en el caso del rebaño de cabras. Estos animales son de una gran importancia, pues podrían resultar indetectables a las pruebas de diagnóstico de tuberculosis y por tanto mantener la infección en el rebaño. El hecho de haber determinado el estado de infección de todos los animales con respecto a *M. bovis* y *Map* mediante cultivo bacteriológico constituye uno de los puntos fuertes de los trabajos realizados. Si bien la sensibilidad de este método no es del 100%, sí lo es su especificidad, por lo que los resultados de los animales con una doble infección resultan indiscutibles.

Todos estos resultados resaltan la interferencia de la infección por *Map* en el diagnóstico de la tuberculosis en las especies rumiantes domésticas. Por ello es de gran importancia la determinación de la presencia/ausencia de paratuberculosis (además de la de tuberculosis) a la hora de valorar las pruebas diagnósticas a aplicar. En ambos estudios se encontró un pequeño porcentaje de animales con tuberculosis que sin embargo resultaban negativos a todos los test aplicados. Este resultado, que puede ser decepcionante desde el punto de vista de la erradicación de la enfermedad, es sin embargo esperable, ya que no hay pruebas capaces de detectar todos los animales enfermos, y aunque la realización de varias técnicas en paralelo puede incrementar la sensibilidad (como de hecho queda demostrado en ambos trabajos) y es por tanto muy recomendable, no hay estrategias infalibles. A este respecto conviene destacar el hecho de que muchos de estos animales “indetectables” presentaron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis en la necropsia, por lo que una correcta inspección *post-mortem* en el matadero los hubiera detectado. Esto resalta la importancia de la vigilancia epidemiológica a nivel de matadero para la detección de animales negativos en el test de IDTB pero infectados por *M. bovis*/*M. caprae*. De esta forma queda patente que, si bien es imposible diseñar una metodología diagnóstica que garantice la detección del 100% de los animales tuberculosos, la correcta aplicación de una buena combinación de las pruebas disponibles debería ser capaz de contribuir a lograr el objetivo de la erradicación de la tuberculosis bovina.

Además de la importancia veterinaria de los miembros del complejo *avium*, el creciente impacto que ejercen sobre la Salud Pública tampoco debe ser soslayado. En este sentido debe

ser destacada la importancia de realizar técnicas de caracterización molecular en los aislados clínicos, ya que, como se ha descrito en la introducción, a menudo los estudios publicados en relación a cepas humanas adolecen de un correcto trabajo de identificación bacteriana. A pesar de que los tratamientos a aplicar sean similares en el caso de todos los miembros de MAC (con la salvedad de *Map*), las consecuencias epidemiológicas de un aislamiento de una cepa de *M. avium* subsp. *avium* son distintas de un *M. avium* subsp. *hominissuis* o de un *M. intracellulare*, pues tienen una distribución distinta. No obstante, debido posiblemente a la creciente incidencia de este grupo de micobacterias en poblaciones inmunocomprometidas, es reseñable el incremento de los esfuerzos en este sentido, lo que ha conducido incluso a la descripción de nuevas especies a partir de aislados clínicos de muestras humanas (Tortoli *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2006).

En el trabajo incluido en el capítulo cuarto, la aplicación de técnicas de caracterización molecular permitió la diferenciación entre un cierto número de aislados clínicos (mayoritariamente cultivados a partir de muestras de orina) idénticos o muy similares a una cepa ambiental ampliamente distribuida en el sistema de canalización de agua de un hospital, y otro grupo de cepas sin relación con las anteriores (ni entre ellas). Los aislados pertenecientes a este último grupo se asociaron mediante criterios médicos con la producción de cuadros clínicos. Estos resultados destacan, por una parte, la utilidad de las técnicas de caracterización molecular en la valoración de relaciones epidemiológicas entre aislados clínicos y ambientales. Además, en el caso que nos ocupa, ciertas características detectadas en los aislados ambientales (y en los aislados clínicos idénticos) como la ausencia del elemento IS1245, la posesión de un *sequevar* 2 de *hsp65*, y la presentación de un cierto perfil de PFGE, podían ser utilizados como “predictores” de patogenicidad; esto es debido a que los aislados que poseían este genotipo no estaban causando procesos clínicos en los pacientes de los que fueron aislados. Aunque es tentador realizar hipótesis con la naturaleza de la asociación entre la presencia de estos rasgos y una baja virulencia, pudiendo especular sobre una posible causalidad, en el presente estudio no hay información suficiente que permita realizar afirmaciones en este sentido.

Nuestros resultados confirman la heterogeneidad existente en la especie *M. avium* subsp. *hominissuis*, ya que, por una parte, un porcentaje muy elevado (81,4%) de los aislados incluidos en el estudio se caracterizaron por la ausencia del elemento IS1245, lo que, aunque ha sido previamente descrito como se detalla en la introducción, resulta del todo inusual, especialmente en un número de aislados tan elevado. La realización de distintas técnicas de identificación molecular – PCRs dirigidas a varios fragmentos de ADN y secuenciación del gen

ARNr 16S, de la secuencia de ITS y del gen *hsp65*, así como detección de algunos LSPs específicos de *M. avium* subsp. *hominissuis* (datos no publicados) – permite además la aseveración de que los aislados citados pertenecen sin duda a esta especie, lo que no puede afirmarse en algunos de los trabajos describiendo cepas IS1245-negativas por falta de contrastación con otras técnicas de identificación a nivel de subespecie.

Por otra parte, otra fuente de variabilidad dentro de *M. avium* subsp. *hominissuis* lo constituye el gen *hsp65*, ya que aunque el número de cepas secuenciado no fue excesivamente elevado (n=52), sí fue suficiente para la descripción de un nuevo *sequevar*, el código 15 (número de acceso de GenBank EU085419). La secuenciación de *hsp65* en varios de los aislados de *M. intracellulare* incluidos en el estudio también reveló una elevada variabilidad, encontrándose también algunas secuencias no descritas anteriormente, si bien la heterogeneidad de este gen en *M. intracellulare* ya ha sido recalcada (Turenne *et al.*, 2006) y por tanto este hallazgo resulta menos significativo.

En todo caso, el trabajo viene a confirmar la ubicuidad de *M. avium* subsp. *hominissuis* en un recinto hospitalario, en concordancia con otros estudios (Von Reyn *et al.*, 1994; Aronson *et al.*, 1999). Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar aislamientos positivos de MAC en muestras no estériles y valorar su significación clínica, ya que en ocasiones resulta muy difícil demostrar si se debe a un fenómeno de contaminación, de colonización transitoria o a una infección (Tobin-D'Angelo *et al.*, 2004). Otros trabajos han hecho referencia a contaminaciones de muestras no estériles con MAC, entre ellas muestras de orina (Graham, Jr. *et al.*, 1988). Nuestros resultados prueban la utilidad de aplicar técnicas de caracterización molecular para tipificar los aislados presentes en un determinado entorno e interpretar la significación clínica de la aparición de distintas cepas de MAC en muestras no estériles, siempre apoyándose en criterios médicos que contribuyan a valorar la existencia o no de infección. Más aún, la creciente aplicación de metodología de biología molecular en aislados de MAC está contribuyendo al descubrimiento de nuevos subtipos de micobacterias con características diferenciales, en ocasiones ligadas a distintas localizaciones geográficas, lo que puede ayudar en el trazado epidemiológico de las infecciones (Murcia *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Primera

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* ha sido aislado de poblaciones de jabalí (*Sus scrofa*) y gamo (*Dama dama*) en España, aunque con bajas prevalencias. Por lo tanto, dichas especies pueden actuar como reservorios del mismo, constituyendo una posible fuente de infección para los rumiantes domésticos. Este hecho debe ser tenido en cuenta en el diseño de los planes de control frente a la paratuberculosis en animales de abasto. Los resultados negativos observados en otras especies de vida salvaje y animales peridomésticos indican una menor implicación en el ciclo de transmisión de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Segunda

La proporción de aislados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pertenecientes al tipo I/III en las áreas estudiadas es mayor que la descrita en otros países europeos. La existencia de infecciones por este tipo de cepas en rebaños de razas bovinas autóctonas en los que no hay un contacto habitual con pequeños rumiantes infectados permite deducir la falta de especificidad de hospedador. Asimismo es reseñable el aislamiento relativamente frecuente de cepas de tipo I/III en razas caprinas autóctonas.

Tercera

El estudio de los polimorfismos de secuencia larga (LSP^A4-II, LSP^A18 y LSP^A20) y de la secuencia del gen *hsp65* revela una mayor homología entre las cepas pertenecientes a los tipos I y III que entre éstas y las de tipo II.

Cuarta

La existencia de infecciones mixtas de tuberculosis (por *M. caprae*) y paratuberculosis da lugar a una pérdida de sensibilidad en las pruebas de diagnóstico de tuberculosis en ganado caprino. Este efecto se observa fundamentalmente en las pruebas cutáneas, especialmente en la intradermotuberculinización comparada. Por ello, el uso de esta prueba debería evitarse en áreas donde ambas enfermedades coexistan, aplicando en su lugar la intradermotuberculinización simple.

Quinta

La aplicación de la intradermotuberculinización simple y el test de detección de Interferón-gamma en paralelo produce un considerable incremento de la sensibilidad del diagnóstico de tuberculosis, siendo ésta la mejor combinación de pruebas para conseguir la detección del máximo número posible de animales infectados.

Sexta

La sensibilidad del test de detección de Interferón-gamma se ve afectada por la presencia de infecciones mixtas de tuberculosis y paratuberculosis en ganado vacuno de lidia. Así, la probabilidad de detectar animales infectados por *M. bovis* es sensiblemente menor si sufren una infección concomitante por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Por lo tanto, resulta de gran importancia la determinación de la presencia o ausencia de paratuberculosis en una explotación a la hora de valorar los resultados obtenidos en esta prueba diagnóstica.

Séptima

Una importante proporción de animales bovinos y caprinos con una infección mixta por *M. bovis*/*M. caprae* y *M. avium* que no responden a las pruebas de detección de inmunidad de base celular sí producen una respuesta inmune de base humoral detectable. De forma inversa, la mayor parte de los animales doblemente infectados que son positivos en el test del Interferón-gamma, resultan negativos en el ELISA de detección de anticuerpos.

Octava

La significación clínica del aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* en muestras clínicas no estériles debe ser evaluada cuidadosamente mediante técnicas de caracterización molecular, ya que su mera presencia podría deberse únicamente a una contaminación ambiental.

Novena

La variabilidad genética de *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* supera significativamente la encontrada en otros miembros del complejo *avium*. Así, el estudio de las secuencias del gen *hsp65* y la distribución de ciertos polimorfismos de secuencia larga (LSPs) revela una mayor diversidad que la descrita por otros autores.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El género *Mycobacterium* comprende especies de gran importancia sanitaria. Además del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en el que se encuadran los agentes causales de la tuberculosis humana y animal, hay un grupo de bacterias conocido como “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas”, de importancia cada vez mayor. El grupo más relevante de estas micobacterias no tuberculosas es el llamado “complejo *Mycobacterium avium*” (MAC). Dicho complejo está formado por dos especies: *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium*, estando ésta última subdividida en cuatro subespecies: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). La subespecie de mayor relevancia veterinaria es *Map*, agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, y cuya posible implicación en el desencadenamiento de la enfermedad de Crohn en humanos aún está bajo estudio. El resto de miembros del complejo son microorganismos ubicuos presentes en el ambiente, en los animales y en el hombre que, de forma general, no causan enfermedad a menos que el hospedador esté

inmunodeprimido. La presente tesis doctoral ha intentado clarificar algunos de los aspectos relacionados con miembros de *MAC* menos estudiados hasta el momento en nuestro país.

El primer estudio se realizó con el fin de determinar la prevalencia de paratuberculosis en poblaciones de vida salvaje y animales peridomésticos en España. Las tasas de infección encontradas mediante cultivo bacteriológico fueron muy bajas (1,5% en jabalíes y 1,1% en gamos), en coincidencia con lo descrito en estas especies en otros países. Sin embargo, el hecho de obtener cultivos positivos a partir de muestras de gamo y jabalí revela la existencia de infecciones por *Map* en estas poblaciones. Por otra parte, las bajas tasas de aislamiento observadas podrían ser debidas hasta cierto punto a una baja sensibilidad del método de cultivo (que fue mejorada en la segunda parte del muestreo), conduciendo por tanto a una subestimación de la tasa de infección real. La existencia de individuos infectados y por tanto potencialmente excretores de la bacteria supone un factor de riesgo para otros animales salvajes y para explotaciones de rumiantes domésticos. De especial trascendencia resulta la capacidad de estos animales salvajes de recorrer grandes distancias de terreno (especialmente en el caso del jabalí), ya que supone que pueden introducir la infección en áreas inicialmente libres de ella.

Las cepas de *Map* pueden agruparse en tipo I (ovino), tipo II (bovino) y tipo III (intermedio), presentando los distintos tipos importantes diferencias en su fenotipo. Los estudios incluidos en el segundo capítulo, destinados a caracterizar las cepas de *Map* aisladas a partir de muestras de ganado rumiante en España, ponen de manifiesto una distribución inusual de los subtipos descritos, especialmente en comparación con lo observado en otros países europeos. En el primer estudio, la dificultad en el aislamiento de ciertos tipos de cepas, unido a la imposibilidad de subdividir los aislados en tipos I, II y III mediante PCR en el momento de iniciar el trabajo hizo que los cultivos se clasificaran como pertenecientes a tipos I/III o a tipo II. Del total de 158 aislados de *Map* procedentes de bovino, ovino y caprino incluidos en el estudio, el 32,9% se incluyeron en los tipos I/III; especialmente relevante fue el aislamiento de este subtipo no sólo a partir de muestras de pequeños rumiantes, sino también de bovinos, sin que pudiera demostrarse un vínculo epidemiológico entre éstos y poblaciones de cabras u ovejas infectadas de paratuberculosis. Esto demuestra que cepas pertenecientes a los tipos I/III pueden mantenerse en poblaciones de bovino sin la presencia de pequeños rumiantes en el entorno, poniendo de manifiesto la ausencia de una especificidad absoluta por un hospedador de este grupo de aislados. De gran relevancia es también la asociación observada entre el aislamiento de cepas de tipo I/III y razas ganaderas autóctonas, confirmada en estudios posteriores.

El estudio de caracterización molecular de los aislados de *Map* procedentes de muestras españolas se completó aplicando técnicas de PCR capaces de diferenciar aislados de los tipos I y II, pero que no habían sido aplicados con anterioridad a cepas de tipo III (caracterizadas como tales mediante la aplicación de electroforesis en campo pulsado). Los resultados al evaluar la presencia/ausencia de grandes polimorfismos (*Large Sequence Polymorphisms*, LSPs) y la secuencia del gen de *hsp65* confirmaron la mayor similitud de los aislados de tipo III con los de tipo I observada en otros estudios, ya que ambos tipos resultaban indistinguibles mediante estas técnicas.

En el tercer capítulo se intentó abordar una de las consecuencias más importantes derivadas de la presencia de la paratuberculosis en una explotación de ganado de abasto: la posible interferencia con las pruebas de diagnóstico de tuberculosis. Teniendo en cuenta que España todavía no ha alcanzado el estatus de oficialmente libre de la enfermedad pero está efectuando un importante esfuerzo para la erradicación de la tuberculosis bovina a través de su Plan Nacional, la prioridad es la detección del máximo número posible de animales infectados. Por ello, los trabajos planteados trataron de evaluar el impacto de la paratuberculosis en la sensibilidad de los test de tuberculosis. La evaluación de las sensibilidades de las pruebas diagnósticas de tuberculosis se realizó tomando el cultivo bacteriológico de *M. bovis*/*M. caprae* y *Map* como referencia.

En el trabajo realizado en un rebaño de cabras con una doble infección natural por tuberculosis y paratuberculosis, la sensibilidad observada en todas las pruebas aplicadas para el diagnóstico de tuberculosis fue menor de lo esperado. En el caso de las pruebas cutáneas (intradermotuberculinización simple y comparada) se detectó además un importante descenso de la sensibilidad en los animales con una doble infección con respecto a los animales que sólo estaban infectados por *M. caprae*. En la especie caprina la tuberculosis tiene una importancia *per se*, pero además puede actuar como reservorio para los bovinos, por lo que los resultados de este estudio pueden tener una gran trascendencia, dada la relativamente elevada prevalencia de paratuberculosis observada en cabras en España.

El segundo trabajo incluido en el tercer capítulo estaba destinado a determinar el posible impacto de la paratuberculosis en la sensibilidad del test de detección de Interferón-gamma (IFN- γ) en un rebaño bovino doblemente infectado. Al igual que en el caso anterior, la sensibilidad diagnóstica observada fue menor de lo esperado, y este resultado fue especialmente marcado en el caso de los animales con una doble infección en comparación con los animales infectados sólo por *M. bovis*. En este trabajo también se evaluó la sensibilidad

aparente de un ELISA de detección de anticuerpos frente a *Map*; de forma sorprendente, esta técnica también fue menos sensible en el caso de animales doblemente infectados. De hecho, el estudio detallado de los resultados de estos animales (infectados simultáneamente por *M. bovis* y *Map*) en el test de IFN- γ y en el ELISA de paratuberculosis reveló que la mayoría de individuos que eran positivos a una de las pruebas eran negativos a la otra, poniendo de manifiesto la compleja interacción existente entre ambas enfermedades.

Por último, debido a la importancia creciente que está adquiriendo el complejo *avium* en salud pública, se planteó un trabajo que evaluara la utilidad de distintas técnicas de caracterización molecular para la comparación de aislados ambientales y cepas procedentes de muestras clínicas en un hospital. Dada la condición de saprofitos de algunos de los miembros de MAC y su ubicuidad, el objetivo del estudio fue determinar la significación clínica del aislamiento de cepas de MAC a partir de muestras no estériles, y poder evaluar la posibilidad de que se produjeran infecciones nosocomiales en pacientes inmunosuprimidos. En este sentido, el aislamiento de una misma cepa de *M. avium* subsp. *hominissuis* a partir de todas las muestras ambientales (procedentes de distintos lugares, y recogidas en momentos diferentes) constituye una demostración de su capacidad de colonizar durante largo tiempo los sistemas de canalización de agua, lo que puede tener una gran importancia en el caso de hospitales. Esta misma cepa fue aislada de un 90,9% de las muestras de orina analizadas y en un 45,4% de las muestras de esputos, mientras que no creció a partir de ninguna de las muestras clínicas estériles incluidas en el estudio. Esto, unido al hecho de que mediante criterios clínicos se concluyera que ninguno de los pacientes en cuyas muestras se aisló esta cepa sufría una infección por MAC, indicó claramente que lo más probable es que se estuviera produciendo una contaminación de dichas muestras con la cepa ambiental. La aplicación de las distintas técnicas moleculares permitió la comparación de los aislados y además reveló varias particularidades inusuales de los aislados estudiados, tales como la ausencia del elemento IS1245 en un 81,4% de los mismos, o la aparición de una secuencia del gen *hsp65* no descrita previamente en un aislado respiratorio. Todo ello constituye una evidencia más de la variabilidad existente en MAC y, más particularmente, en *M. avium* subsp. *hominissuis*, lo que abre la puerta a nuevos trabajos que permitan un conocimiento más profundo de su evolución y que contribuyan a la comprensión de las enfermedades a las que dan lugar.

SUMMARY

Many bacterial species of great sanitary importance belong to the genus *Mycobacterium*. The most important group is the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which includes the causative agents of human and animal tuberculosis; besides, there are other mycobacteria known as “environmental mycobacteria”, “atypical mycobacteria” or “non tuberculous mycobacteria”, that have a rising impact. The most important group of these non tuberculous mycobacteria is the *Mycobacterium avium* complex (MAC). This complex is formed by two species: *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium avium*, with the last species being subdivided in four subspecies: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). The most important subspecies in animal health is *Map*, causative agent of the paratuberculosis, also known as Johne’s disease, and whose involvement in the pathogenesis of Crohn’s disease is still a controversial issue. The other members of the complex are ubiquitous microorganisms present in the environment, in animals and in humans that usually do not cause disease unless the host is immunocompromised. This thesis was designed to address some of the issues related to MAC members that were understudied in our country.

The first study was performed to determine the prevalence of paratuberculosis in wildlife and peridomestic animals in Spain. The infection rates obtained using bacteriology were very low (1.54% in wild boars and 1.06% in fallow deer), which is in agreement with previous reports in these species in other countries of Western Europe. However, finding positive cultures from samples coming from wild boar and fallow deer reveals the presence of *Map* infections in these populations. On the other hand, the low recovery rates observed in our study could be due in part to a low sensitivity of the culture method (which was improved in the second part of the study), thus yielding an underestimation of the true prevalence. Anyway, the presence of infected animals and therefore potential excretors of the bacteria represents a risk factor for other wild animals and for domestic ruminant herds. The great mobility of these species and their ability to cover broad distances (especially wild boars) makes this finding particularly important, as they could introduce the disease in areas initially free of paratuberculosis.

Map strains can be classified in type I (sheep strains), type II (bovine strains) and type III (intermediate). These types show important differences in their phenotypes. The studies performed to characterize *Map* isolates recovered from ruminant samples from Spain reveal an unusual distribution of the mentioned subtypes in our country, especially regarding reports from other European countries. Performing characterization techniques that need high quantities of bacterial DNA is difficult in some *Map* isolates, as they can be extremely slow growing *Map* strains. On the other hand, at the beginning of this study there was no way of classifying the isolates in types I, II and III by means of PCR techniques. Therefore in this work isolates were classified as belonging to types I/III or II. From all 158 *Map* isolates cultured from cattle, sheep and goat samples in this study, 32.9% were included in types I/III; of special importance is the isolation of this subtype of strains not only from small ruminant tissues, but also from cattle samples, without an evident epidemiological link between these and goat or sheep flocks infected with *Map*. This demonstrates that strains belonging to type I/III can maintain the infection in cattle populations without the action of small ruminants, therefore revealing the lack of an absolute specificity of host in this group of isolates. The association found between type I/III strains and native Spanish breeds, confirmed in later studies is also remarkable.

The molecular characterization analysis of *Map* isolates recovered from Spanish ruminants was completed using PCR techniques designed to distinguish between types I and II, but that had not been previously applied to type III strains. A higher similarity was observed between types I and III after the examination of the presence or absence of several LSPs (*Long Sequence Polymorphisms*) and the analysis of the DNA sequence of the *hsp65* gene. Both types

exhibit the same LSPs pattern and the same *hsp65* sequevar, different from those of type II strains.

The third chapter was aimed at the study of one of the most important consequences of the presence of Johne's disease in a domestic ruminant herd: the potential interference caused by paratuberculosis in tuberculosis routine diagnostic tests. Spain has not yet achieved the Officially Tuberculosis Free (OTF) status, but has an ongoing eradication program that has reduced tuberculosis prevalences considerably. The priority in this program is the detection of the maximum number of infected animals. This is why studies included in this chapter were focused on the impact of paratuberculosis in the sensitivity of tuberculosis-diagnostic tests. Evaluation of the sensitivities of the diagnostic tests under study was performed using bacterial culture as the gold standard.

In the study carried out in a goat flock with a natural mixed infection with tuberculosis and paratuberculosis, sensitivity of all diagnostic tests used for tuberculosis diagnosis were below the values published in previous reports. Regarding skin tests (single intradermal tuberculin test and single intradermal cervical comparative test), a marked fall on the sensitivity was observed in animals with a dual infection compared to animals suffering only tuberculosis. Caprine tuberculosis is important *per se*, but also infected goats can act as reservoirs for cattle; therefore, our findings may have a great impact, taking into account the relatively high paratuberculosis prevalence observed in goats in Spain.

The second study included in the third chapter was designed to determine the possible effect of natural co-infection by *M. bovis* and *Map* on the performance of Interferon-gamma (IFN- γ) detection assay for the diagnosis of tuberculosis in a bullfighting cattle herd. As in the report mentioned before, sensitivity of the tuberculosis diagnostic test was lower than expected, especially in animals with a dual infection (compared to animals infected only by *M. bovis*). The sensitivity of an ELISA for the detection of *Map* specific antibodies was also assessed; surprisingly, this technique was also less sensitive in animals with a mixed infection. In this sense, a precise analysis of the results of the IFN- γ and the paratuberculosis ELISA in these animals with a mixed infection (by *M. bovis* and *Map*) reveals that most of the positive animals in one test were negative to the other. This highlights the complex interaction that might exist between the two diseases.

Finally, due to the increasing impact of the *avium* complex in Public Health, another study evaluating the usefulness of different molecular characterization techniques in the

comparison of environmental and clinical MAC isolates was performed in a human hospital. As some MAC members are ubiquitous and can act as saprophytic bacteria, the aim of the study was to assess the clinical significance of MAC isolation in non-sterile samples, and evaluate the risk of nosocomial infections in immunocompromised patients. In this sense, the isolation of a certain *M. avium* subsp. *hominissuis* strain from all environmental samples (coming from different areas of the hospital, and recovered at different times) represents an evidence of its ability to colonize the water distribution systems for long periods of time, which could have a major importance in hospitals. The same strain was isolated in 90.9% of the urine samples and in 45.4% of the sputum samples, but was not recovered from any of the sterile clinical samples included in the study (that yielded different MAC strains). This, together with clinical findings indicating that none of the patients in whose samples the environmental strain was isolated were suffering a MAC infection, pointed out the hypothesis of a contamination of the non-sterile clinical samples with the environmental strain. The use of the molecular techniques allowed the comparison of the isolates, and also revealed several: the absence of the IS1245 element in 81.4% of the *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates analyzed, as well as a new *hsp65* sequevar in a strain recovered from a respiratory sample. Our findings demonstrate the genetic variability present in MAC, and more precisely in *M. avium* subsp. *hominissuis*. This suggests the convenience of performing new molecular studies that provides a greater insight into the evolution of MAC, and contributes to the understanding of the diseases due to its members.

BIBLIOGRAFÍA

- (1997). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **156**, S1-25.
- (2005). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*--New York City, 2001-2004. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* **54**, 605-608.
- Aagaard, C., Govaerts, M., Meng, Okkels L., Andersen, P., y Pollock, J. M. (2003). Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 3719-3728.
- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S. H., y Hunter, P. R. (2007a). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: A systematic review and meta-analysis. *Inflamm.Bowel.Dis.*
- Abubakar, I., Myhill, D. J., Hart, A. R., Lake, I. R., Harvey, I., Rhodes, J. M., Robinson, R., Lobo, A. J., Probert, C. S., y Hunter, P. R. (2007b). A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease--further investigation of the possible role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Am.J.Epidemiol.* **165**, 776-783.
- Adúriz, G., Juste, R. A., Garrido, J. M., y Geijo, M. V. (2000). Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. En 'Bovis, Aula Veterinaria'. (Ed. R. A. Juste.) pp. 63-93. Luzan 5, Madrid, España.)
- Adúriz, J. J., Juste, R. A., y Cortabarría, N. (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet.Microbiol.* **45**, 211-217.
- Ahrens, P., Giese, S. B., Klausen, J., y Inglis, N. F. (1995). Two markers, IS901-IS902 and p40, identified by PCR and by using monoclonal antibodies in *Mycobacterium avium* strains. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 1049-1053.
- Aller, B., Fernández-Díez, M., y Escudero-Díez, A (1973). Paratuberculosis ovina. *Sup. Cient. Bol. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. Esp.* **196**, 11-18.

- Álvarez, J., de Juan, L., Aranaz, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., y Domínguez, L. (2006). A survey on paratuberculosis in wildlife in Spain. In 'Proc.8th.Int.Coll.Paratub.'. (E. J. Manning y S. S. Nielsen Eds.) Madison, WI, USA.)
- Álvarez, J., De, Juan L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernández-Garayzábal, J. F., y Mateos, A. (2005). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. Vet.Rec. **156**, 212-213.
- Amadori, M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Telo, P., Pacciarini, L., y Bonizzi, L. (2002). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the *avium/intracellulare* group. J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health **49**, 89-96.
- Amonsin, A., Li, L. L., Zhang, Q., Bannantine, J. P., Motiwala, A. S., Sreevatsan, S., y Kapur, V. (2004). Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains. J.Clin.Microbiol. **42**, 1694-1702.
- Anderson, J. L., Meece, J. K., Koziczowski, J. J., Clark, D. L., Jr., Radcliff, R. P., Nolden, C. A., Samuel, M. D., y Ellingson, J. L. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. J.Wildl.Dis. **43**, 302-308.
- Angus, K. W. (1990). Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). J.Comp Pathol. **103**, 101-105.
- Anon. (2002). Off.J.Eur.L179 13-18.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., y Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. **53**, 1785-1789.
- Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A. I., Briones, V., Mateos, A., y Domínguez, L. (2004). Bovine Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Wildlife in Spain. J.Clin.Microbiol. **42**, 2602-2608.
- Aranaz, A., del Río, R., Ruiz, J., Liébana, E., Montero, N., de Juan, L., Vela, A. I., Mateos, A., y Domínguez, L. Effect of the paratuberculosis vaccine on the IFN-gamma test for tuberculosis in goats. Third international conference on *Mycobacterium bovis* . 2000. Comunicación oral.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gomez-Mampaso, E., Galán, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., y Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int.J.Syst.Bacteriol. **49 Pt 3**, 1263-1273.
- Aronson, T., Holtzman, A., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Berlin, O. G., Hill, H., y Stelma, G., Jr. (1999). Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. J Clin.Microbiol. **37**, 1008-1012.
- Arrigoni, N., Cammi, G., Galleti, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., y Belletti, G. L. (2007). Bulk milk contamination by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and related risk factors. Proc.9th.Int.Coll.Paratub. **9**.
- Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., y Riley, L. W. (1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science **261**, 1454-1457.
- Ashford, D. A., Whitney, E., Raghunathan, P., y Cosivi, O. (2001). Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev.Sci.Tech. **20**, 325-337.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Buchler, M. W., y Schmidt, J. (2005). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. Gut **54**, 944-949.
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., y Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. Vet.Microbiol. **103**, 209-217.

- Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., y Pavlik, I. (2005). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 1210-1214.
- Baksh, F. K., Finkelstein, S. D., riyamayagam-Baksh, S. M., Swalsky, P. A., Klein, E. C., y Dunn, J. C. (2004). Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the microdissected granulomas of Crohn's disease. *Mod.Pathol.* **17**, 1289-1294.
- Balseiro, A., Prieto, J. M., Espi, A., Pérez, V., y García Marín, J. F. (2003). Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet.J.* **166**, 210-212.
- Bannantine, J. P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., y Kapur, V. (2002). Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 1303-1310.
- Bannantine, J. P., Hansen, J. K., Paustian, M. L., Amonsin, A., Li, L. L., Stabel, J. R., y Kapur, V. (2004). Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 106-114.
- Bannantine, J. P. y Stabel, J. R. (2002). Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC.Microbiol.* **2**, 2.
- Bannantine, J. P. y Stabel, J. R. (2000). HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet.Microbiol.* **76**, 343-358.
- Bannantine, J. P., Zhang, Q., Li, L. L., y Kapur, V. (2003). Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC.Microbiol.* **3**, 10.
- Barclay, R., Ewing, D. F., y Ratledge, C. (1985). Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Bacteriol.* **164**, 896-903.
- Barta, Z., Csipo, I., Mekkel, G., Zehner, M., y Majoros, L. (2004). Seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's Disease. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 5432-5433.
- Bartos, M., Hlozek, P., Svastova, P., Dvorska, L., Bull, T., Matlova, L., Parmova, I., Kuhn, I., Stubbs, J., Moravkova, M., Kintz, J., Beran, V., Melicharek, I., Ocepek, M., y Pavlik, I. (2006). Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J.Microbiol.Methods* **64**, 333-345.
- Bauer, J. y Andersen, A. B. (1999). Stability of insertion sequence IS1245, a marker for differentiation of *Mycobacterium avium* strains. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 442-444.
- Bauer, J., Andersen, A. B., Askgaard, D., Giese, S. B., y Larsen, B. (1999). Typing of clinical *Mycobacterium avium* complex strains cultured during a 2-year period in Denmark by using IS1245. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 600-605.
- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H., y Baljer, G. (1996). Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J.Clin.Microbiol.* **34**, 1617-1621.
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., y Sharp, J. M. (2001a). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 1517-1521.
- Beard, P. M., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S. M., Sinclair, M. C., Wildblood, L. A., Jones, D. G., y Sharp, J. M. (2001b). Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 3080-3084.
- Beggs, M. L., Stevanova, R., y Eisenach, K. D. (2000). Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 508-512.

- Behr, M. A. y Mostowy, S. (2007). Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Curr.Mol.Med.* **7**, 309-317.
- Behr, M. A. y Schurr, E. (2006). Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm.Bowel.Dis.* **12**, 1000-1004.
- Behr, M. A., Semret, M., Poon, A., y Schurr, E. (2004). Crohn's disease, mycobacteria, and NOD2. *Lancet Infect.Dis.* **4**, 136-137.
- Belknap, E. B., Getzy, D. M., Johnson, L. W., Ellis, R. P., Thompson, G. L., y Shulaw, W. P. (1994). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **204**, 1805-1808.
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A. A., y Stelwagen, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet.Rec.* **121**, 142-146.
- Bensch, S. y Akesson, M. (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Mol.Ecol.* **14**, 2899-2914.
- Beran, V., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Smigic, N., y Pavlik, I. (2007). The effect of chemical and physical stress factors on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Bergey, G. H., Harrison, F. C., Breed, R. S., Hammer, B. W., and Huntoon, F. M. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, MD, USA.)
- Berghaus, R. D., Farver, T. B., Anderson, R. J., Jaravata, C. C., y Gardner, I. A. (2006). Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J.Dairy Sci.* **89**, 963-970.
- Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Rawsthorne, P., y Collins, M. T. (2004). Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 1129-1135.
- Bernstein, C. N., Nayar, G., Hamel, A., y Blanchard, J. F. (2003). Study of animal-borne infections in the mucosas of patients with inflammatory bowel disease and population-based controls. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 4986-4990.
- Bernstein, C. N., Wang, M. H., Sargent, M., Brant, S. R., y Collins, M. T. (2007). Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J.Clin.Microbiol.* **45**, 968-971.
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M., y Mikula, I. (2006). IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet.Microbiol.* **112**, 33-41.
- Billman-Jacobe, H., Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L. A., Gill, I. J., Hill, J. F., Jessep, T., Milner, A. R., y Wood, P. R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust.Vet.J.* **69**, 25-28.
- Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y., Wolfe, J., y Kabani, A. M. (2000). Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 2846-2852.
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., y Bottger, E. C. (1990). Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J.Clin.Microbiol.* **28**, 1751-1759.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J. P., Berkvens, D., y Godfroid, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet.Microbiol.* **77**, 269-281.
- Bono, M., Jemmi, T., Bernasconi, C., Burki, D., Telenti, A., y Bodmer, T. (1995). Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 371-373.
- Borody, T. J., Bilkey, S., Wettstein, A. R., Leis, S., Pang, G., y Tye, S. (2007). Anti-mycobacterial therapy in Crohn's disease heals mucosa with longitudinal scars. *Dig.Liver Dis.* **39**, 438-444.

- Borody, T. J., Leis, S., Warren, E. F., y Surace, R. (2002). Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy--approaching a cure? *Dig.Liver Dis.* **34**, 29-38.
- Borremans, M., de Wit L., Volckaert, G., Ooms, J., De Bruyn J., Huygen, K., Van Vooren, J. P., Stelandre, M., Verhofstadt, R., y Content, J. (1989). Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **57**, 3123-3130.
- Bosshard, C., Stephan, R., y Tasara, T. (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J.Food Prot.* **69**, 1662-1667.
- Brey, B. J., Radcliff, R. P., Clark, D. L., Jr., y Ellingson, J. L. (2006). Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. *Mol.Cell Probes* **20**, 51-59.
- Brotherston, J. B., Gilmour, N. J. L., y Mc Samuel, J. (1961). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. *J.Comp.Pathol.* **71**, 286-299.
- Brown-Elliott, B. A. y Wallace, R. J., Jr. (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin.Microbiol.Rev.* **15**, 716-746.
- Brumbaugh, G. W., Edwards, J. F., Roussel, A. J., Jr., y Thomson, T. D. (2000). Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis. *J.Comp Pathol.* **123**, 22-28.
- Buddle, B. M., McCarthy, A. R., Ryan, T. J., Pollock, J. M., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Andersen, P., y de Lisle, G. W. (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet.Rec.* **153**, 615-620.
- Buergelt, C. D. y Duncan, J. R. (1978). Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **173**, 478-480.
- Buergelt, C. D. y Ginn, P. E. (2000). The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*). *Vet.Microbiol.* **77**, 325-331.
- Buergelt, C. D., Green, S. L., Mayhew, I. G., Wilson, J. H., y Merritt, A. M. (1988). Avian mycobacteriosis in three horses. *Cornell Vet.* **78**, 365-380.
- Buergelt, C. D., Hall, C., McEntee, K., y Duncan, J. R. (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet.Pathol.* **15**, 196-207.
- Buergelt, C. D., Layton, A. W., Ginn, P. E., Taylor, M., King, J. M., Habecker, P. L., Mauldin, E., Whitlock, R., Rossiter, C., y Collins, M. T. (2000). The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet.Pathol.* **37**, 428-438.
- Bull, T. J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El-Zaatari, F., y Tizard, M. (2000a). Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* **146** (Pt 9), 2185-2197.
- Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2003a). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 2915-2923.
- Bull, T. J., Shanson, D. C., y Archard, L. C. (1995). Rapid identification of mycobacteria from AIDS patients by capillary electrophoretic profiling of amplified SOD gene. *Clin.Mol.Pathol.* **48**, M124-M132.
- Bull, T. J., Sheridan, J. M., Martín, H., Sumar, N., Tizard, M., y Hermon-Taylor, J. (2000b). Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (*mpa*) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **77**, 453-463.

- Bull, T. J., Sidi-Boumedine, K., McMinn, E. J., Stevenson, K., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2003b). Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol.Cell.Probes* **17**, 157-164.
- Burki, D. R., Bernasconi, C., Bodmer, T., y Telenti, A. (1995). Evaluation of the relatedness of strains of *Mycobacterium avium* using pulsed-field gel electrophoresis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **14**, 212-217.
- Burns, D. N., Wallace, R. J., Jr., Schultz, M. E., Zhang, Y. S., Zubairi, S. Q., Pang, Y. J., Gibert, C. L., Brown, B. A., Noel, E. S., y Gordin, F. M. (1991). Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am.Rev.Respir.Dis.* **144**, 1153-1159.
- Cagiola, M., Feliziani, F., Severi, G., Pasquali, P., y Rutili, D. (2004). Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **11**, 952-956.
- Carrigan, M. J. y Seaman, J. T. (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust.Vet.J.* **67**, 47-50.
- Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., De, Juan L., Álvarez, J., Bezos, J., Rodríguez, S., Stevenson, K., Mateos, A., y Domínguez, L. (2007). Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *J.Clin.Microbiol.* **45**, 3439-3442.
- Castets, M., Rist, N., y Boisvert, H. (1969). La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine d'Afrique Noire* **4**, 321-322.
- Cerf, O., Griffiths, M., y Aziza, F. (2007). Assessment of the Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. *Foodborne.Pathog.Dis.* **4**, 433-447.
- Cernicchiaro, N., Wells, S. J., Janagama, H., y Sreevatsan, S. (2008). Influence of Type of Culture Medium on Characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Subtypes. *J.Clin.Microbiol.* **46**, 145-149.
- Cetinkaya, B., Erdogan, H. M., y Morgan, K. L. (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet.Rec.* **143**, 265-269.
- Chemlal, K., Huys, G., Fonteyne, P. A., Vincent, V., Lopez, A. G., Rigouts, L., Swings, J., Meyers, W. M., y Portaels, F. (2001). Evaluation of PCR-restriction profile analysis and IS2404 restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification and typing of *Mycobacterium ulcerans* and *M. Marínium*. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 3272-3278.
- Chi, J., VanLeeuwen, J. A., Weersink, A., y Keefe, G. P. (2002). Management factors related to seroprevalences to bovine viral-diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev.Vet.Med.* **55**, 57-68.
- Chiodini, R. J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin.Microbiol.Rev.* **2**, 90-117.
- Chiodini, R. J. (1990). Bactericidal activities of various antimicrobial agents against human and animal isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**, 366-367.
- Chiodini, R. J. y Van Kruiningen, H. J. (1983). Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **182**, 168-169.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., y Merkal, R. S. (1984a). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* **74**, 218-262.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Thayer, W. R., Jr., y Coutu, J. A. (1984b). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J.Clin.Microbiol.* **20**, 966-971.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Thayer, W. R., y Coutu, J. A. (1986). Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J.Clin.Microbiol.* **24**, 357-363.

- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Thayer, W. R., Coutu, J. A., y Merkal, R. S. (1984c). In vitro antimicrobial susceptibility of a *Mycobacterium* sp. isolated from patients with Crohn's disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 930-932.
- Cho, H. S., Kim, Y. H., y Park, N. Y. (2006). Disseminated mycobacteriosis due to *Mycobacterium avium* in captive Bengal tiger (*Panthera tigris*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 312-314.
- Christiansen, M., Ottosen, H. E., Plum, N. (1946). A peculiar infection with acid-fast bacteria in wood pigeons (*Columba palumbus* L.) *Skand. Vet.-Tidsskr.* **36**, 352-369
- Chui, L. W., King, R., Lu, P., Manninen, K., y Sim, J. (2004). Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**, 39-45.
- Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., y Paolicchi, F. (2007). [*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food and its relationship with Crohn's disease]. *Rev. Argent. Microbiol.* **39**, 57-68.
- Clancy, R., Ren, Z., Turton, J., Pang, G., y Wettstein, A. (2007). Molecular evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in Crohn's disease correlates with enhanced TNF-alpha secretion. *Dig. Liver Dis.* **39**, 445-451.
- Clark, D. L., Jr., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J., y Ellingson, J. L. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell Probes* **20**, 197-202.
- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* **116**, 217-261.
- Clarke, C. J. y Little, D. (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* **114**, 419-437.
- Cline, J. M., Schlafer, D. W., Callihan, D. R., Vanderwall, D., y Drazek, F. J. (1991). Abortion and granulomatous colitis due to *Mycobacterium avium* complex infection in a horse. *Vet. Pathol.* **28**, 89-91.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de, Kesel M., Poupart, P., y Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 328-345.
- Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneff, J. F., Cocito, C., y Gala, J. L. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3048-3054.
- Coffin, J. W., Condon, C., Compston, C. A., Potter, K. N., Lamontagne, L. R., Shafiq, J., y Kunimoto, D. Y. (1992). Use of restriction fragment length polymorphisms resolved by pulsed-field gel electrophoresis for subspecies identification of mycobacteria in the *Mycobacterium avium* complex and for isolation of DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1829-1836.
- Collins, D. M., Cavaignac, S., y de Lisle, G. W. (1997). Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol. Cell Probes* **11**, 373-380.
- Collins, D. M., De Zoete, M., y Cavaignac, S. M. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4760-4762.
- Collins, D. M., Gabric, D. M., y de Lisle, G. W. (1990a). Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1591-1596.
- Collins, D. M., Gabric, D. M., y de Lisle, G. W. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**, 175-178.
- Collins, D. M., Stephens, D. M., y de Lisle, G. W. (1993). Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* **36**, 289-299.

- Collins, M. T. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **12**, 357-371.
- Collins, M. T. (1997). *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *J.Dairy Sci.* **80**, 3445-3448.
- Collins, M. T., Kenefick, K. B., Sockett, D. C., Lambrecht, R. S., McDonald, J., y Jorgensen, J. B. (1990b). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J.Clin.Microbiol.* **28**, 2514-2519.
- Collins, M. T., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D., Christensen, S., Reichelderfer, M., Hoiby, N., Harms, B. A., Thomsen, O. O., Skibsted, U., y Binder, V. (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 4373-4381.
- Collins, M. T. y Shin, S. J. (2007). Thipurine drugs (azathioprine and 6-mercaptopurine) inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth *in vitro*. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Collins, M. T., Sockett, D. C., Goodger, W. J., Conrad, T. A., Thomas, C. B., y Carr, D. J. (1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **204**, 636-641.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., y Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **12**, 685-692.
- Collins, P., McDiarmid, A., Thomas, L. H., y Matthews, P. R. (1985). Comparison of the pathogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium* spp isolated from the wood pigeon (*Columba palumbus*-L). *J.Comp Pathol.* **95**, 591-597.
- Commichau, C. (1982). [Diagnosis of paratuberculosis in fallow deer (*Dama dama*)]. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* **95**, 248-250.
- Cook, W. E., Cornish, T. E., Shideler, S., Lasley, B., y Collins, M. T. (1997). Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. *J.Wildl.Dis.* **33**, 635-637.
- Corn, J. L., Manning, E. J., Sreevatsan, S., y Fischer, J. R. (2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 6963-6967.
- Corpa, J. M., Garrido, J., García Marín, J. F., y Pérez, V. (2000a). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J.Comp Pathol.* **122**, 255-265.
- Corpa, J. M., Pérez, V., Sánchez, M. A., y Marín, J. F. (2000b). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet.Rec.* **146**, 195-196.
- Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D. M., Butler, W. R., Dawson, D., Rodríguez, D., Loureiro, J., Romano, M. I., Alito, A., Zumarraga, M., y Bernardelli, A. (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **53**, 1305-1314.
- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J., y Kluver, P. (1999). *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol.Cell Probes* **13**, 431-442.
- Cousins, D. V., Williams, S. N., Hope, A., y Eamens, G. J. (2000). DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust.Vet.J.* **78**, 184-190.
- Coussens, P. M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect.Immun.* **72**, 3089-3096.
- Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L., y Stelma, G. N., Jr. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**, 2492-2496.

- Crohn, B., Ginzburg, L., y Oppenheimer, G. (1932). Regional ileitis, a pathological and clinical entity. *J.Am.Med.Assoc.* **99**, 1323-1329.
- Cuttino, J. T. y McCabe, A. M. (1949). Pure granulomatous nocardiosis, a new fungus disease distinguished by intracellular parasitism; a description of a new disease in man due to a hitherto undescribed organism, *Nocardia intracellularis*, n. sp., including a study of the biologic and pathogenic properties of this species. *Am.J.Pathol.* **25**, 1-47.
- Dalovisio, J. R., Stetter, M., y Mikota-Wells, S. (1992). Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. *Clin.Infect.Dis.* **15**, 598-600.
- Dalziel, T. K. (1913). Chronic interstitial enteritis. *Br.Med.J.* **2**, 1068-1070.
- Damato, J. J. y Collins, M. T. (1990). Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet.Microbiol.* **22**, 31-42.
- Damato, J. J., Collins, M. T., y McClatchy, J. K. (1982). Urease testing of mycobacteria with BACTEC radiometric instrumentation. *J.Clin.Microbiol.* **15**, 478-480.
- Damato, J. J., Knisley, C., y Collins, M. T. (1987). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* by gas-liquid and thin-layer chromatography and rapid demonstration of mycobactin dependence using radiometric methods. *J.Clin.Microbiol.* **25**, 2380-2383.
- Daniels, M. J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J. M., y Hutchings, M. R. (2003a). The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol.Infect.* **130**, 553-559.
- Daniels, M. J., Hutchings, M. R., Beard, P. M., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., y Sharp, J. M. (2003b). Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? *J.Wildl.Dis.* **39**, 10-15.
- Daniels, M. J., Hutchings, M. R., y Greig, A. (2003c). The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol.Infect.* **130**, 561-568.
- Daniels, M. J., Lees, J. D., Hutchings, M. R., y Greig, A. (2003d). The ranging behaviour and habitat use of rabbits on farmland and their potential role in the epidemiology of paratuberculosis. *Vet.J.* **165**, 248-257.
- Dargatz, D. A., Byrum, B. A., Barber, L. K., Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Shulaw, W. P., Jacobson, R. H., y Stabel, J. R. (2001a). Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **218**, 1163-1166.
- Dargatz, D. A., Byrum, B. A., Hennager, S. G., Barber, L. K., Koprak, C. A., Wagner, B. A., y Wells, S. J. (2001b). Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **219**, 497-501.
- Davidson, W. R., Manning, E. J., y Nettles, V. F. (2004). Culture and serologic survey for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among southeastern white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J.Wildl.Dis.* **40**, 301-306.
- De Bruyn J., Bosmans, R., Nyabenda, J., y Van Vooren, J. P. (1989). Effect of zinc deficiency on the appearance of two immunodominant protein antigens (32 kDa and 65 kDa) in culture filtrates of mycobacteria. *J.Gen.Microbiol.* **135**, 79-84.
- de Juan, L. Paratuberculosis caprina. Aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. 2005. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- de Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezós, J., Mateos, A., y Domínguez, L. (2006a). Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet.Microbiol.* **115**, 102-110.

- de Juan, L., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., y Domínguez, L. (2006b). Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 5927-5932.
- de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J. M., y Stevenson, K. (2005). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet.Microbiol.* **106**, 249-257.
- de la Rúa-Domenech (2006). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)* **86**, 77-109.
- de la Rúa-Domenech, Goodchild, A. T., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Christiansen, K. H., y Clifton-Hadley, R. S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res.Vet.Sci.* **81**, 190-210.
- de Lisle, G. W., Cannon, M. C., Yates, G. F., y Collins, D. M. (2006). Use of a polymerase chain reaction to subtype *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, an increasingly important pathogen from farmed deer in New Zealand. *N.Z.Vet.J.* **54**, 195-197.
- de Lisle, G. W., Collins, D. M., y Huchzermeyer, H. F. (1992). Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J.Vet.Res.* **59**, 163-165.
- de Lisle, G. W., Seguin, P., Samagh, B. S., Corner, A. H., y Duncan, J. R. (1980). Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can.J.Comp Med.* **44**, 177-182.
- de Lisle, G. W., Yates, G. F., Cavaignac, S. M., Collins, D. M., Paterson, B. M., y Montgomery, R. H. (2003). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feral ferrets - a potentia reservoir of Johne's disease. En 'Proc.7th Int.Coll.Paratub.'. (R. A. Juste, M. V. Geijo, y J. M. Garrido Eds.) pp. 361-362. Madison, WI, USA.)
- de Lisle, G. W., Yates, G. F., y Collins, D. M. (1993). Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Vet.Diagn.Invest* **5**, 567-571.
- de Lisle, G. W., Yates, G. F., Joyce, M. A., Cavaignac, S. M., Hynes, T. J., y Collins, D. M. (1998). Case report and DNA characterization of *Mycobacterium avium* isolates from multiple animals with lesions in a beef cattle herd. *J.Vet.Diagn.Invest* **10**, 283-284.
- De Smet, K. A., Brown, I. N., Yates, M., y Ivanyi, J. (1995). Ribosomal internal transcribed spacer sequences are identical among *Mycobacterium avium-intracellulare* complex isolates from AIDS patients, but vary among isolates from elderly pulmonary disease patients. *Microbiology* **141** (Pt 10), 2739-2747.
- Devallois, A., Goh, K. S., y Rastogi, N. (1997a). Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 2969-2973.
- Devallois, A., Picardeau, M., Paramasivan, C. N., Vincent, V., y Rastogi, N. (1997b). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates giving discordant results in AccuProbe tests by PCR-restriction enzyme analysis, 16S rRNA gene sequencing, and DT1-DT6 PCR. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 2767-2772.
- Devallois, A. y Rastogi, N. (1997). Computer-assisted analysis of *Mycobacterium avium* fingerprints using insertion elements IS1245 and IS1311 in a Caribbean setting. *Res.Microbiol.* **148**, 703-713.
- Dhand, N. K., Eppeleston, J., Whittington, R. J., y Toribio, J. A. L. M. L. (2007). Association of farm management and soil risk factors with ovine Johne's disease in Australia. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- di Guardo G., de, Angelis G., y Longo, P. L. (1991). Atypical *M avium* induced tubercular lesions in pigs. *Vet.Rec.* **129**, 476.
- Diéguez, F. J., Arnaiz, I., Sanjuán, M. L., Vilar, M. J., López, M., y Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev.Vet.Med.* **82**, 321-326.

- Dimarelli, Z., Xenos, G., Argyroudis, S., y Papadopoulos, O. (1991). A survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. *Paratuberculosis Newsletter* **3**, 8-9.
- Djonne, B., Pavlik, I., Svastova, P., Bartos, M., y Holstad, G. (2005). IS900 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet.Scand.* **46**, 13-18.
- Doherty, M. L., Bassett, H. F., Quinn, P. J., Davis, W. C., y Monaghan, M. L. (1995a). Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am.J.Vet.Res.* **56**, 1300-1306.
- Doherty, M. L., Monaghan, M. L., Bassett, H. F., y Quinn, P. J. (1995b). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res.Vet.Sci.* **58**, 217-221.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T. J., y Gerlach, G. F. (2003). Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 5215-5223.
- Doig, C., Muckersie, L., Watt, B., y Forbes, K. J. (2002). Molecular epidemiology of *Mycobacterium malmoeense* infections in Scotland. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 1103-1105.
- Donaghy, J. A., Linton, M., Patterson, M. F., y Rowe, M. T. (2007). Effect of high pressure and pasteurization on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. *Lett.Appl.Microbiol.* **45**, 154-159.
- Donaghy, J. A., Rowe, M. T., Rademaker, J. L., Hammer, P., Herman, L., De, Jonghe, V., Blanchard, B., Duhem, K., y Vindel, E. (2008). An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiol.* **25**, 128-135.
- Donaghy, J. A., Totton, N. L., y Rowe, M. T. (2003). Iodixanol development of a laboratory-scale technique to monitor the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Cheddar cheese. *Scientific World Journal.* **3**, 1241-1248.
- Donaghy, J. A., Totton, N. L., y Rowe, M. T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 4899-4905.
- Doran, T. J., Davies, J. K., Radford, A. J., y Hodgson, A. L. (1994). Putative functional domain within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. *Immunol.Cell Biol.* **72**, 427-434.
- Dow, C. T. (2006). Paratuberculosis and Type I diabetes: is this the trigger? *Med.Hypotheses* **67**, 782-785.
- Drake, T. A., Hindler, J. A., Berlin, O. G., y Bruckner, D. A. (1987). Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J.Clin.Microbiol.* **25**, 1442-1445.
- Dreier, S., Khol, J. L., Stein, B., Fuchs, K., Gutler, S., y Baumgartner, W. (2006). Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **53**, 477-481.
- Dubash, K., Shulaw, W. P., Bech-Nielsen, S., Stills, H. F., Jr., y Slemons, R. D. (1996). Evaluation of an agar gel immunodiffusion test kit for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **208**, 401-403.
- Dufour, B., Pouillot, R., y Durand, B. (2004). A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet.Res.* **35**, 69-81.
- Dukes, T. W., Glover, G. J., Brooks, B. W., Duncan, J. R., y Swendrowski, M. (1992). Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J.Wildl.Dis.* **28**, 161-170.
- Dunn, J. R., Kaneene, J. B., Grooms, D. L., Bolin, S. R., Bolin, C. A., y Bruning-Fann, C. S. (2005). Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or

- antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **226**, 429-435.
- Dvorska, L., Bartos, M., Ostadal, O., Kaustova, J., Matlova, L., y Pavlik, I. (2002). IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin.Microbiol.* **40**, 3712-3719.
- Dvorska, L., Bull, T. J., Bartos, M., Matlova, L., Svastova, P., Weston, R. T., Kintr, J., Parmova, I., van Soolingen, D., y Pavlik, I. (2003). A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J.Microbiol.Methods* **55**, 11-27.
- Dvorska, L., Matlova, L., Ayele, W. Y., Fischer, O. A., Amemori, T., Weston, R. T., Álvarez, J., Beran, V., Moravkova, M., y Pavlik, I. (2007). Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeideae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Vet.Microbiol.* **119**, 366-374.
- Dvorska, L., Matlova, L., Bartos, M., Parmova, I., Bartl, J., Svastova, P., Bull, T. J., y Pavlik, I. (2004). Study of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from cattle in the Czech Republic between 1996 and 2000. *Vet.Microbiol.* **99**, 239-250.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., y Raviglione, M. C. (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**, 677-686.
- Eamens, G. J., Whittington, R. J., Marsh, I. B., Turner, M. J., Saunders, V., Kemsley, P. D., y Rayward, D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet.Microbiol.* **77**, 357-367.
- Eamens, G. J., Whittington, R. J., Turner, M. J., Austin, S. L., Fell, S. A., y Marsh, I. B. (2007). Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet.Microbiol.* **125**, 22-35.
- Eda, S., Bannantine, J. P., Waters, W. R., Mori, Y., Whitlock, R. H., Scott, M. C., y Speer, C. A. (2006). A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme- linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin.Vaccine Immunol.* **13**, 837-844.
- EFSA (2006). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* **94**, 1-236.
- el Zaatar, F. A., Naser, S. A., Markesich, D. C., Kalter, D. C., Engstand, L., y Graham, D. Y. (1996). Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J.Clin.Microbiol.* **34**, 2240-2245.
- Ellingson, J. L., Anderson, J. L., Kozickowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., y Sullivan, N. M. (2005a). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J.Food Prot.* **68**, 966-972.
- Ellingson, J. L., Bolin, C. A., y Stabel, J. R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol.Cell Probes* **12**, 133-142.
- Ellingson, J. L., Cheville, J. C., Brees, D., Miller, J. M., y Cheville, N. F. (2003). Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin.Med.Res.* **1**, 217-226.
- Ellingson, J. L., Stabel, J. R., Bishai, W. R., Frothingham, R., y Miller, J. M. (2000). Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol.Cell Probes* **14**, 153-161.
- Ellingson, J. L., Stabel, J. R., Radcliff, R. P., Whitlock, R. H., y Miller, J. M. (2005b). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol.Cell Probes* **19**, 219-225.
- Emery, D. L. y Whittington, R. J. (2004). An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet.Microbiol.* **104**, 143-155.

- Englund, S. Molecular biology techniques as a tool for detection and characterisation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 2002. Dept. of Veterinary Microbiology, SLU. Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Veterinaria vol. 123. Tesis Doctoral.
- Englund, S., Bolske, G., y Johansson, K. E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol.Lett. **209**, 267-271.
- Eppleston, J. y Whittington, R. J. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. Aust.Vet.J. **79**, 776-777.
- Eppleston, J. y Windsor, P. A. (2007). Lesions attributed to vaccination of sheep with Gudair for the control of ovine paratuberculosis: post farm economic impacts at slaughter. Aust.Vet.J. **85**, 129-133.
- Evans, J. T., Smith, E. G., Banerjee, A., Smith, R. M., Dale, J., Innes, J. A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R. G., Smith, N. H., Hawkey, P. M., y Sonnenberg, P. (2007). Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. Lancet **369**, 1270-1276.
- Ewer, K., Cockle, P., Gordon, S., Mansoor, H., Govaerts, M., Walravens, K., Marche, S., Hewinson, G., y Vordermeier, M. (2006). Antigen mining with iterative genome screens identifies novel diagnostics for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Clin.Vaccine Immunol. **13**, 90-97.
- Falkinham, J. O., III (2003b). The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. Can.J.Infect.Dis. **14**, 281-286.
- Falkinham, J. O., III (2003a). Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. Appl.Environ.Microbiol. **69**, 5685-5689.
- Falkinham, J. O., III (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin.Microbiol.Rev. **9**, 177-215.
- Fang, Y., Wu, W. H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S. A., Nelson, E. A., Epperson, W. B., y Christopher-Hennings, J. (2002). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. J.Clin.Microbiol. **40**, 287-291.
- Fanning, A. y Edwards, S. (1991). *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. Lancet **338**, 1253-1255.
- Fawcett, A. R., Goddard, P. J., McKelvey, W. A., Buxton, D., Reid, H. W., Greig, A., y MacDonald, A. J. (1995). Johne's disease in a herd of farmed red deer. Vet.Rec. **136**, 165-169.
- Feizabadi, M. M., Robertson, I. D., Cousins, D. V., Dawson, D., Chew, W., Gilbert, G. L., y Hampson, D. J. (1996a). Genetic characterization of *Mycobacterium avium* isolates recovered from humans and animals in Australia. Epidemiol.Infect. **116**, 41-49.
- Feizabadi, M. M., Robertson, I. D., Cousins, D. V., y Hampson, D. J. (1996b). Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J.Clin.Microbiol. **34**, 1136-1142.
- Feizabadi, M. M., Robertson, I. D., Hope, A., Cousins, D. V., y Hampson, D. J. (1997). Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. Aust.Vet.J. **75**, 887-889.
- Feldman, W. H., Davies, R., Moses, H. E., y Andberg, W. (1943). An unusual mycobacterium isolate from a sputum of a man suffering from pulmonary disease of long duration. Am.Rev.Tuberc. **48**, 272-290.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G. E., Jemmi, T., Baumgartner, A., y Egger, M. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect.Dis. **7**, 607-613.
- Ferroglio, E., Nebbia, P., Robino, P., Rossi, L., y Rosati, S. (2000). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two free-ranging Alpine ibex. Rev.Sci.Tech. **19**, 859-862.

- Field, S. K., Fisher, D., y Cowie, R. L. (2004). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* **126**, 566-581.
- Fischer, O., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Melicharek, I., y Pavlik, I. (2000). Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol.(Praha)* **45**, 147-152.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Melicharek, I., Weston, R. T., y Pavlik, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med.Vet.Entomol.* **15**, 208-211.
- Fischer, O. A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du, Maine R., Melicharek, I., Bartos, M., y Pavlik, I. (2003). Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. *Vet.Microbiol.* **91**, 325-338.
- Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Peral, D. L., Weston, R. T., Bartos, M., y Pavlik, I. (2004). Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet.Microbiol.* **102**, 247-255.
- Fleischman, R. W., du Moulin, G. C., Esber, H. J., Ilievski, V., y Bogden, A. E. (1982). Nontuberculous mycobacterial infection attributable to *Mycobacterium intracellulare* serotype 10 in two rhesus monkeys. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **181**, 1358-1362.
- Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., y Lykotrafitis, F. (2007). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol.Infect.* 1-9.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., y Jurtshuk, P., Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42**, 166-170.
- Francis, J., MACTURK, H. M., MADINAVEITIA, J., y SNOW, G. A. (1953). Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem.J.* **55**, 596-607.
- Frothingham, R. y Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144 (Pt 5)**, 1189-1196.
- Frothingham, R. y Wilson, K. H. (1993). Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J.Bacteriol.* **175**, 2818-2825.
- Frothingham, R. y Wilson, K. H. (1994). Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful divisions. *J.Infect.Dis.* **169**, 305-312.
- Fujita, H., Eishi, Y., Ishige, I., Saitoh, K., Takizawa, T., Arima, T., y Koike, M. (2002). Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J.Gastroenterol.* **37**, 509-516.
- Gaafar, A., Unzaga, M. J., Cisterna, R., Clavo, F. E., Urrea, E., Ayarza, R., y Martín, G. (2003). Evaluation of a modified single-enzyme amplified-fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolates. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 3846-3850.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., y Odumeru, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J.Dairy Sci.* **85**, 3198-3205.
- Garrido, F. y León, Vizcaíno L. (1979). Diagnóstico de paratuberculosis caprina en Andalucía. VII Congr.Nac.Microbiol., SEM.Cádiz, España.
- Garrido, J. M., Cortabarria, N., Oguiza, J. A., Adúriz, G., y Juste, R. A. (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet.Microbiol.* **77**, 379-386.
- Garrido, J. M., Molina, E., Geijo, M. V., Plazaola, J. M., Sevilla, I., y Juste, R. A. (2007). Preliminary evaluation of a field trial on the use of vaccination i dairy cattle farms with paratuberculosis. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* **9**.
- Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S. B., Irvine, E. J., Jewell, D. P., Rachmilewitz, D., Sachar, D. B., Sandborn, W. J., y Sutherland, L. R. (2000). A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm.Bowel.Dis.* **6**, 8-15.

- Gasteiner, J., wad-Masalmeh, M., y Baumgartner, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet.Microbiol.* **77**, 339-349.
- Ghadiali, A. H., Strother, M., Naser, S. A., Manning, E. J., y Sreevatsan, S. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 5345-5348.
- Giese, S. B. y Ahrens, P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet.Microbiol.* **77**, 291-297.
- Gill, I. J. y Blandy, M. L. (1986). Control of avian tuberculosis in a commercial poultry flock. *Aust.Vet.J.* **63**, 422-423.
- Gingeras, T. R., Ghandour, G., Wang, E., Berno, A., Small, P. M., Drobniowski, F., Alland, D., Desmond, E., Holodniy, M., y Drenkow, J. (1998). Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res.* **8**, 435-448.
- Girardin, S. E., Hugot, J. P., y Sansonetti, P. J. (2003). Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* **24**, 652-658.
- Godfroid, J., Boelaert, F., Heier, A., Clavareau, C., Wellemans, V., Desmecht, M., Roels, S., y Walravens, K. (2000). First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet.Microbiol.* **77**, 283-290.
- Godfroid, J., Delcorps, C., Irenge, L. M., Walravens, K., Marche, S., y Gala, J. L. (2005). Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and Hpy188I enzymatic restriction of duplex amplicons. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 4640-4648.
- González, J., Geijo, M. V., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J. M., Reyes, L. E., Ferreras, M. C., Juste, R. A., García Marín, J. F., y Pérez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J.Comp Pathol.* **133**, 184-196.
- Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., McGill, K., y Collins, J. D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet.Microbiol.* **112**, 171-179.
- Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Gavin, P., Juste, R. A., Martín, C., Acevedo, P., de La Puente M., y Hofle, U. (2005). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet.Res.* **36**, 43-52.
- Goto, M., Oka, S., Okuzumi, K., Kimura, S., y Shimada, K. (1991). Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J.Clin.Microbiol.* **29**, 2473-2476.
- Graham, L., Jr., Warren, N. G., Tsang, A. Y., y Dalton, H. P. (1988). *Mycobacterium avium* complex pseudobacteriuria from a hospital water supply. *J.Clin.Microbiol.* **26**, 1034-1036.
- Grange, J. M. (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb.)* **81**, 71-77.
- Grant, I. R. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J.Appl.Microbiol.* **98**, 1282-1293.
- Grant, I. R., Ball, H. J., y Rowe, M. T. (2002a). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**, 2428-2435.
- Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F., y Rowe, M. T. (2002b). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**, 602-607.
- Grant, I. R., O'Riordan, L. M., Ball, H. J., y Rowe, M. T. (2001). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet.Microbiol.* **79**, 123-131.

- Grant, I. R., Pope, C. M., O'Riordan, L. M., Ball, H. J., y Rowe, M. T. (2000). Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet.Microbiol.* **77**, 369-378.
- Grant, I. R., Williams, A. G., Rowe, M. T., y Muir, D. D. (2005). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 2853-2861.
- Green, E. P., Tizard, M. L., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J., y Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9063-9073.
- Greenstein, R. J. (2003). Is Crohn's disease caused by a *mycobacterium*? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect.Dis.* **3**, 507-514.
- Greenstein, R. J., Su, L., y Brown, S. T. (2007). *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) the cause of multiple "autoimmune" and "inflammatory" diseases in man? Inferences from the antiMAP activity of methotrexate, 6-MP, 5-ASA and thalidomide on MAP culture. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Pérez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M. E., McKendrick, I., y Sharp, J. M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1746-1751.
- Greig, A., Stevenson, K., Pérez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., y Sharp, J. M. (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet.Rec.* **140**, 141-143.
- Grewal, S. K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., y Michel, F. C., Jr. (2006). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 565-574.
- Griffin, J. F., Spittle, E., Rodgers, C. R., Liggett, S., Cooper, M., Bakker, D., y Bannantine, J. P. (2005). Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **12**, 1401-1409.
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T., y Telenti, A. (1995). A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 304-307.
- Gumber, S., Eamens, G., y Whittington, R. J. (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet.Microbiol.* **115**, 91-101.
- Gumber, S., Taylor, D. L., Marsh, I. B., y Whittington, R. J. (2007). Survival, dormancy and the proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Gumber, S. y Whittington, R. J. (2007). Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet.Microbiol.* **119**, 42-52.
- Gunnes, G., Nord, K., Vatn, S., y Saxegaard, F. (1995). A case of generalised avian tuberculosis in a horse. *Vet.Rec.* **136**, 565-566.
- Guthertz, L. S., Damsker, B., Bottone, E. J., Ford, E. G., Midura, T. F., y Janda, J. M. (1989). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J.Infect.Dis.* **160**, 1037-1041.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M. S., Van Embden, J. D., Marín, J. F., y Martín, C. (1997). Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 3328-3330.
- Gutiérrez, M., Tellechea, J., y García Marín, J. F. (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet.Microbiol.* **62**, 281-290.

- Gwozdz, J. M., Reichel, M. P., Murray, A., Manktelow, W., West, D. M., y Thompson, K. G. (1997). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet.Microbiol.* **57**, 233-244.
- Gwozdz, J. M., Thompson, K. G., Manktelow, B. W., Murray, A., y West, D. M. (2000a). Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust.Vet.J.* **78**, 560-566.
- Gwozdz, J. M., Thompson, K. G., Murray, A., Reichel, M. P., Manktelow, B. W., y West, D. M. (2000b). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust.Vet.J.* **78**, 779-783.
- Gwozdz, J. M., Thompson, K. G., Murray, A., West, D. M., y Manktelow, B. W. (2000c). Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep. *Aust.Vet.J.* **78**, 622-624.
- Hacker, U., Huttner, K., y Konow, M. (2004). [Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpomerania, Germany]. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* **117**, 140-144.
- Hagan, W. A. (1938). Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell Vet.* **28**, 34.
- Harmsen, D., Dostal, S., Roth, A., Niemann, S., Rothganger, J., Sammeth, M., Albert, J., Frosch, M., y Richter, E. (2003). RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species. *BMC.Infect.Dis.* **3**, 26.
- Harn, H. J., Shen, K. L., Ho, L. I., Yu, K. W., Liu, G. C., Yueh, K. C., y Lee, J. H. (1997). Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J.Clin.Pathol.* **50**, 505-508.
- Harris, N. B. y Barletta, R. G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**, 489-512.
- Hazra, R., Lee, S. H., Maslow, J. N., y Husson, R. N. (2000). Related strains of *Mycobacterium avium* cause disease in children with AIDS and in children with lymphadenitis. *J Infect.Dis.* **181**, 1298-1303.
- Hector, J. S., Pang, Y., Mazurek, G. H., Zhang, Y., Brown, B. A., y Wallace, R. J., Jr. (1992). Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 1250-1255.
- Hejlícek, K. y Tremblé, F. (1995). [Comparison of the pathogenesis and epizootologic importance of avian mycobacteriosis in various types of domestic and free-living syntropic birds]. *Vet.Med.(Praha)* **40**, 187-194.
- Helie, P. y Higgins, R. (1996). *Mycobacterium avium* complex abortion in a mare. *J.Vet.Diagn.Invest* **8**, 257-258.
- Hermon-Taylor, J. (2002). Treatment with drugs active against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* can heal Crohn's disease: more evidence for a neglected public health tragedy. *Dig.Liver Dis.* **34**, 9-12.
- Hermon-Taylor, J. (2001). Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* **49**, 755-756.
- Hermon-Taylor, J. y Bull, T. (2002). Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J.Med.Microbiol.* **51**, 3-6.
- Hermon-Taylor, J., Bull, T. J., Sheridan, J. M., Cheng, J., Stellakis, M. L., y Sumar, N. (2000). Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can.J.Gastroenterol.* **14**, 521-539.
- Hermoso de Mendoza J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J. M., Rey, J. M., Pena, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixido, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., y Hermoso de, Mendoza M. (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Prev.Vet.Med.* **74**, 239-247.

- Herthnek, D. y Bolske, G. (2006). New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC.Microbiol. **6**, 87.
- Herthnek, D., Englund, S., Willemsen, P. T., y Bolske, G. (2006). Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. J.Appl.Microbiol. **100**, 1095-1102.
- Hewes, C. A., Schneider, R. K., Baszler, T. V., y Oaks, J. L. (2005). Septic arthritis and granulomatous synovitis caused by infection with *Mycobacterium avium* complex in a horse. J.Am.Vet.Med.Assoc. **226**, 2035-8, 2002.
- Hope, A. F., Kluver, P. F., Jones, S. L., y Condron, R. J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. Aust.Vet.J. **78**, 850-856.
- Hope, J. C., Thom, M. L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., y Howard, C. J. (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. Clin.Exp.Immunol. **141**, 432-439.
- Horn, B., Forshaw, D., Cousins, D., y Irwin, P. J. (2000). Disseminated *Mycobacterium avium* infection in a dog with chronic diarrhoea. Aust.Vet.J. **78**, 320-325.
- Horsburgh, C. R., Jr. (1991). *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N.Engl.J.Med. **324**, 1332-1338.
- Horsburgh, C. R., Jr., Gettings, J., Alexander, L. N., y Lennox, J. L. (2001). Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. Clin.Infect.Dis. **33**, 1938-1943.
- Hughes, V. M., Stevenson, K., y Sharp, J. M. (2001). Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria. J.Microbiol.Methods **44**, 209-215.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., y Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature **411**, 599-603.
- Hulten, K., El-Zimaity, H. M., Karttunen, T. J., Almashhrawi, A., Schwartz, M. R., Graham, D. Y., y el-Zaatari, F. A. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. Am.J.Gastroenterol. **96**, 1529-1535.
- Hulten, K., Karttunen, T. J., El-Zimaity, H. M., Naser, S. A., Almashhrawi, A., Graham, D. Y., y el-Zaatari, F. A. (2000a). *In situ* hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. Vet.Microbiol. **77**, 513-518.
- Hulten, K., Karttunen, T. J., El-Zimaity, H. M., Naser, S. A., Collins, M. T., Graham, D. Y., y el-Zaatari, F. A. (2000b). Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. J.Microbiol.Methods **42**, 185-195.
- Huntley, J. F., Whitlock, R. H., Bannantine, J. P., y Stabel, J. R. (2005). Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American bison. Vet.Pathol. **42**, 42-51.
- Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, K., Portaels, F., y Swings, J. (2000). Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. J.Clin.Microbiol. **38**, 3675-3680.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., Roubal, P., Lukas, J., Cook, N., y Gazouli, M. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Appl.Environ.Microbiol. **71**, 8934-8936.
- Imaeda, T. (1985). Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium africanum*. Int.J.Syst.Bacteriol. **35**, 147-150.

- Inderlied, C. B., Kemper, C. A., y Bermudez, L. E. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. Clin.Microbiol.Rev. **6**, 266-310.
- Jakobsen, M. B., Alban, L., y Nielsen, S. S. (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. Prev.Vet.Med. **46**, 15-27.
- Jaravata, C. V., Smith, W. L., Rensen, G. J., Ruzante, J., y Cullor, J. S. (2007). Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Foodborne.Pathog.Dis. **4**, 103-106.
- Jeyanathan, M., Alexander, D. C., Turenne, C. Y., Girard, C., y Behr, M. A. (2006). Evaluation of *in situ* methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. J.Clin.Microbiol. **44**, 2942-2950.
- Johansen, T. B., Djonne, B., Jensen, M. R., y Olsen, I. (2005). Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. J.Clin.Microbiol. **43**, 2500-2502.
- Johansen, T. B., Olsen, I., Jensen, M. R., Dahle, U. R., Holstad, G., y Djonne, B. (2007). New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. BMC.Microbiol. **7**, 14.
- Johne, H. A. y Frothingham, L. (1895). Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. Deut.Zeits.Tiermed.Vergl.Pathol. **21**, 438-454.
- Johnson-Ifeorulundu, Y. y Kaneene, J. B. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. Am.J.Vet.Res. **60**, 589-596.
- Johnson-Ifeorulundu, Y., Kaneene, J. B., y Lloyd, J. W. (1999). Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. J.Am.Vet.Med.Assoc. **214**, 822-825.
- Johnson-Ifeorulundu, Y. J. y Kaneene, J. B. (1997). Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. J.Am.Vet.Med.Assoc. **210**, 1735-1740.
- Johnson-Ifeorulundu, Y. J., Kaneene, J. B., Sprecher, D. J., Gardiner, J. C., y Lloyd, J. W. (2000). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. Prev.Vet.Med. **46**, 171-181.
- Jorgensen, J. B. (1982). An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta Vet.Scand. **23**, 325-335.
- Jorgensen, J. B. (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord.Vet.Med. **29**, 267-270.
- Jorgensen, J. B. y Clausen, B. (1976). Mycobacteriosis in a roe-deer caused by wood-pigeon mycobacteria. Nord.Vet.Med. **28**, 539-546.
- Juan, C., Fernández, J., Domingo, M., y Adúriz, G. (1996). Tuberculosis aviar en aves no domésticas. Med.Vet. **13**, 135-151.
- Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D. J., y Hutchings, M. R. (2005). Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? Appl.Environ.Microbiol. **71**, 6033-6038.
- Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Davidson, R. S., y Hutchings, M. R. (2006). Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. Appl.Environ.Microbiol. **72**, 398-403.
- Juste, R. A., Cuervo, L. A., Gelabert, J. L., Saéz de Ocáriz, C., Marco, J. C., y Camón, J. (1983). Paratuberculosis bovina en Vizcaya. Hyg.Pec. **5**, 57-66.

- Juste, R. A., Garrido, J. M., Geijo, M., Elguezal, N., Adúriz, G., Atxaerandio, R., y Sevilla, I. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J.Vet.Diagn.Invest* **17**, 354-359.
- Juste, R. A., Marco, J. C., Sáez, de Ocariz, y Adúriz, J. J. (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **28**, 385-390.
- Kalis, C. H., Collins, M. T., Hesselink, J. W., y Barkema, H. W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet.Microbiol.* **97**, 73-86.
- Kalis, C. H., Hesselink, J. W., Barkema, H. W., y Collins, M. T. (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. *Am.J.Vet.Res.* **62**, 270-274.
- Karakousis, P. C., Moore, R. D., y Chaisson, R. E. (2004). *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet Infect.Dis.* **4**, 557-565.
- Karlson, A. G. y Lessel, E. F. (1970). *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **20**, 273-282.
- Kasai, H., Ezaki, T., y Harayama, S. (2000). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 301-308.
- Kauppinen, J., Mantjarvi, R., y Katila, M. L. (1994). Random amplified polymorphic DNA genotyping of *Mycobacterium malmoeense*. *J.Clin.Microbiol.* **32**, 1827-1829.
- Kawaji, S., Taylor, D. L., Mori, Y., y Whittington, R. J. (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet.Microbiol.* **125**, 36-48.
- Kehrli, M. E., Jr., Nonnecke, B. J., y Roth, J. A. (1989). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am.J.Vet.Res.* **50**, 215-220.
- Keller, A. P., Beggs, M. L., Amthor, B., Bruns, F., Meissner, P., y Haas, W. H. (2002). Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 1869-1872.
- Kennedy, D. J. y Allworth, M. B. (2000). Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Vet.Microbiol.* **77**, 443-451.
- Kennedy, D. J. y Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev.Sci.Tech.* **20**, 151-179.
- Khol, J. L., Beran, V., Kralik, P., Tesinska, I., Aurich, C., Pavlik, I., y Baumgartner, W. (2007a). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in semen and organs of a breeding bull. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Khol, J. L., Damoser, J., Dunser, M., y Baumgartner, W. (2007b). Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria--current status, compulsory measures and first experiences. *Prev.Vet.Med.* **82**, 302-307.
- Kiehnbaum, L. A., Amonsins, A., Wells, S. J., y Kapur, V. (2005). Amplified fragment length polymorphism to detect clonal diversity and distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in selected Minnesota dairy cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* **17**, 311-315.
- Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., y Kook, Y. H. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1714-1720.
- Kim, H., Kim, S. H., Shim, T. S., Kim, M. N., Bai, G. H., Park, Y. G., Lee, S. H., Chae, G. T., Cha, C. Y., Kook, Y. H., y Kim, B. J. (2005). Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **55**, 1649-1656.

- Kim, S. G., Shin, S. J., Jacobson, R. H., Miller, L. J., Harpending, P. R., Stehman, S. M., Rossiter, C. A., y Lein, D. A. (2002). Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Vet.Diagn.Invest* **14**, 126-131.
- Klitgaard, Nielsen K. y Ahrens, P. (2002). Putative in vitro expressed gene fragments unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol.Lett.* **214**, 199-203.
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., y Nishiguchi, A. (2007). Present approach to Johne's disease control in Japan and the feature of its incidence. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Koets, A. P., Rutten, V. P., de Boer M., Bakker, D., Valentin-Weigand, P., y van, Eden W. (2001). Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect.Immun.* **69**, 1492-1498.
- Kohler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Drager, K. G., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cubler, K., Klawonn, W., y Hess, R. G. (2001). Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **48**, 185-195.
- Koivula, T., Ekman, M., Leitner, T., Lofdahl, S., Ghebremicahel, S., Mostowy, S., Behr, M. A., Svenson, S. B., y Kallenius, G. (2004). Genetic characterization of the Guinea-Bissau family of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Microbes.Infect.* **6**, 272-278.
- Komijn, R. E., de Haas, P. E., Schneider, M. M., Eger, T., Nieuwenhuijs, J. H., van den Hoek, R. J., Bakker, D., Zijl Erveld, F. G., y van Soelingen, D. (1999). Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs in The Netherlands and comparison of IS1245 restriction fragment length polymorphism patterns of porcine and human isolates. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1254-1259.
- Kopečna, M., Ondrus, S., Literak, I., Klimes, J., Horvathova, A., Moravkova, M., Bartos, M., Trcka, I., y Pavlik, I. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *J.Wildl.Dis.* **42**, 691-695.
- Koren, O. (2007). Johne's disease control program in Israeli dairy farms - prevalence in national level. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Kormendy, B. (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet.Microbiol.* **41**, 117-125.
- Kovich, D. A., Wells, S. J., y Friendshuh, K. (2006). Evaluation of the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program as a source of replacement cattle. *J.Dairy Sci.* **89**, 3466-3470.
- Kramsky, J. A., Miller, D. S., Hope, A., y Collins, M. T. (2000). Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **77**, 333-337.
- Kristjansson, M., Green, P., Manning, H. L., Slutsky, A. M., Brecher, S. M., Von Reyn, C. F., Arbeit, R. D., y Maslow, J. N. (1993). Molecular confirmation of bacillus Calmette-Guerin as the cause of pulmonary infection following urinary tract instillation. *Clin.Infect.Dis.* **17**, 228-230.
- Krzywinska, E. y Schorey, J. S. (2003). Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* strains of diverse virulence with a focus on the glycopeptidolipid biosynthesis cluster. *Vet.Microbiol.* **91**, 249-264.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., y Niemann, S. (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 3070-3077.
- Kumar, S., Bose, M., y Isa, M. (2006). Genotype analysis of human *Mycobacterium avium* isolates from India. *Indian J Med.Res.* **123**, 139-144.

- Kunze, Z. M., Portaels, F., y McFadden, J. J. (1992). Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 2366-2372.
- Kunze, Z. M., Wall, S., Appelberg, R., Silva, M. T., Portaels, F., y McFadden, J. J. (1991). IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol.Microbiol.* **5**, 2265-2272.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., y Cutlip, R. C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **36**, 255-257.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., y VARDAMAN, T. H. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **17**, 549-551.
- Larsen, A. B., Moon, H. W., y Merkal, R. S. (1971). Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **32**, 589-595.
- Larsen, A. B., Stalheim, O. H., Hughes, D. E., Appell, L. H., Richards, W. D., y Himes, E. M. (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **179**, 169-171.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I. L., Poli, G., y Bonizzi, L. (2000). Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet.J.* **160**, 17-24.
- Le Dantec C., Duguet, J. P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., y Vincent, V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**, 5318-5325.
- Lebrun, L., Espinasse, F., Poveda, J. D., y Vincent-Levy-Frebault, V. (1992). Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 2476-2478.
- Legrand, E., Devallois, A., Horgen, L., y Rastogi, N. (2000a). A molecular epidemiological study of *Mycobacterium simiae* isolated from AIDS patients in Guadeloupe. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 3080-3084.
- Legrand, E., Radegonde, N., Goh, K. S., y Rastogi, N. (2002). A pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium fortuitum* in a Caribbean setting underlines high genetic diversity of the strains and excludes nosocomial outbreaks. *Int.J.Med.Microbiol.* **292**, 51-57.
- Legrand, E., Sola, C., Verdol, B., y Rastogi, N. (2000b). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* recovered from AIDS patients in the caribbean as studied by a consensus IS1245-RFLP method and pulsed-field gel electrophoresis. *Res.Microbiol.* **151**, 271-283.
- Leifsson, P. S., Olsen, S. N., y Larsen, S. (1997). Ocular tuberculosis in a horse. *Vet.Rec.* **141**, 651-654.
- Levy-Frebault, V. V., Thorel, M. F., Varnerot, A., y Gicquel, B. (1989). DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, "wood pigeon mycobacteria," and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. *J.Clin.Microbiol.* **27**, 2823-2826.
- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., y Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 12344-12349.
- Liébana, E., Aranaz, A., Urquía, J. J., Mateos, A., y Domínguez, L. (1998). Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust.Vet.J.* **76**, 50-53.
- Lilenbaum, W., Ferreira, R., Marassi, C. D., Ristow, P., Oelemann, W. M. R., y Fonseca, L. D. S. (2007). Interference of tuberculosis on the performance of ELISAs used in the diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Braz.J.Microbiol.* **38**, 472-477.
- Lillini, E., De Grossi, L., Bitonti, G., y Cersini, A. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in commercially pasteurized cow's milk in Italy. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Linton, C. J., Jalal, H., Leeming, J. P., y Millar, M. R. (1994). Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J.Clin.Microbiol.* **32**, 2169-2174.

- Loftus, E. V., Jr. y Sandborn, W. J. (2002). Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.Clin.North Am.* **31**, 1-20.
- Losinger, W. C. (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J.Dairy Res.* **72**, 425-432.
- Lovell, R., Levi, M. L., y Francis, J. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J.Comp.Pathol.* **34**, 120-129.
- Lund, B. M., Gould, G. W., y Rampling, A. M. (2002). Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int.J.Food Microbiol.* **77**, 135-145.
- Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagy, G., Lipiec, M., Ocepek, M., y Pavlik, I. (2003). Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 and 2001. *Vet.Med.(Praha)* **48**, 51-65.
- Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O. A., y Pavlik, I. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet.Microbiol.* **101**, 225-234.
- Mackintosh, C., Haigh, J. C., y Griffin, F. (2002). Bacterial diseases of farmed deer and bison. *Rev.Sci.Tech.* **21**, 249-263.
- Mackintosh, C. G., Labes, R. E., Clark, R. G., de Lisle, G. W., y Griffin, J. F. (2007). Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *N.Z.Vet.J.* **55**, 23-29.
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., y Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J.Bacteriol.* **178**, 1274-1282.
- Mainar-Jaime, R. C. y Vázquez-Boland, J. A. (1998). Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev.Vet.Med.* **34**, 317-327.
- Manning, E. J. (2001). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a review of current knowledge. *J.Zoo.Wildl.Med.* **32**, 293-304.
- Manning, E. J. y Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev.Sci.Tech.* **20**, 133-150.
- Manning, E. J., Kucera, T. E., Gates, N. B., Woods, L. M., y Fallon-McKnight, M. (2003). Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *J.Wildl.Dis.* **39**, 323-328.
- Manning, E. J., Steinberg, H., Rossow, K., Ruth, G. R., y Collins, M. T. (1998). Epizootic of paratuberculosis in farmed elk. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **213**, 1320-1321.
- Marco, I., Ruiz, M., Juste, R., Garrido, J. M., y Lavin, S. (2002). Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain. *J.Wildl.Dis.* **38**, 629-632.
- Marks, J., Jenkins, P. A., y Schaefer, W. B. (1969). Identification and incidence of a third type of *Mycobacterium avium*. *Tubercle.* **50**, 394-395.
- Marsh, I., Whittington, R., y Cousins, D. (1999). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol.Cell Probes* **13**, 115-126.
- Marsh, I., Whittington, R., y Millar, D. (2000). Quality control and optimized procedure of hybridization capture-PCR for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Mol.Cell Probes* **14**, 219-232.

- Marsh, I. B., Bannantine, J. P., Paustian, M. L., Tizard, M. L., Kapur, V., y Whittington, R. J. (2006). Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J.Bacteriol.* **188**, 2290-2293.
- Marsh, I. B. y Whittington, R. J. (2007). Genomic diversity in *Mycobacterium avium*: Single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and with *M. a. avium*. *Mol.Cell.Probes* **21**, 66-75.
- Marsh, I. B. y Whittington, R. J. (2001). Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Mol.Cell Probes* **15**, 105-118.
- Marsh, I. B. y Whittington, R. J. (2005). Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol.Cell Probes* **19**, 371-384.
- Martín-Hernando, M. P., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J. M., de la, Fuente J., y Gortázar, C. (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis.(Edinb.)* **87**, 360-367.
- Martins, A. B., Matos, E. D., y Lemos, A. C. (2005). Infection with the *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions: a case report and literature review. *Braz.J.Infect.Dis.* **9**, 173-179.
- Martinson, S. A., Hanna, P. E., Ikede, B. O., Lewis, J. P., Miller, L. M., Keefe, G. P., y McKenna, S. L. (2008). Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *J.Vet.Diagn.Invest* **20**, 51-57.
- Matlova, L., Dvorska, L., Ayele, W. Y., Bartos, M., Amemori, T., y Pavlik, I. (2005). Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 1261-1268.
- Matlova, L., Dvorska, L., Palecek, K., Maurenc, L., Bartos, M., y Pavlik, I. (2004). Impact of sawdust and wood shavings in bedding on pig tuberculous lesions in lymph nodes, and IS1245 RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* of serotypes 6 and 8 isolated from pigs and environment. *Vet.Microbiol.* **102**, 227-236.
- Matsiota-Bernard, P., Waser, S., Tassios, P. T., Kyriakopoulos, A., y Legakis, N. J. (1997). Rapid discrimination of *Mycobacterium avium* strains from AIDS patients by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 1585-1588.
- Matsiota-Bernard, P., Zinzendorf, N., Onody, C., y Guenounou, M. (2000). Comparison of clarithromycin-sensitive and clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* strains isolated from AIDS patients during therapy regimens including clarithromycin. *J.Infect.* **40**, 49-54.
- Matthews, P. R., McDiarmid, A., Collins, P., y Brown, A. (1978). The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. *J.Med.Microbiol.* **11**, 53-57.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., y Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 1901-1906.
- McAdam, R. A., Selwyn, Q., y Guilhot, C. (2000). Mycobacterial transposons and their applications. In 'Molecular genetics of Mycobacteria'. (G. F. Hatfull y W. R. JacobsEds.) pp. 69-84. (ASM Press: Washington, D.C. USA.)
- McClure, H. M., Chiodini, R. J., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Thayer, W. R., y Coutu, J. A. (1987). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J.Infect.Dis.* **155**, 1011-1019.
- McDonald, W. L., O'Riley, K. J., Schroen, C. J., y Condrón, R. J. (2005). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 1785-1789.
- McDonald, W. L., Ridge, S. E., Hope, A. F., y Condrón, R. J. (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust.Vet.J.* **77**, 113-119.

- McFadden, J. J., Butcher, P. D., Chiodini, R., y Hermon-Taylor, J. (1987). Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J.Clin.Microbiol.* **25**, 796-801.
- McGarvey, J. A. y Bermudez, L. E. (2001). Phenotypic and genomic analyses of the *Mycobacterium avium* complex reveal differences in gastrointestinal invasion and genomic composition. *Infect.Immun.* **69**, 7242-7249.
- McKenna, S. L., Keefe, G. P., Barkema, H. W., y Sockett, D. C. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet.Microbiol.* **110**, 105-111.
- McKenna, S. L., Keefe, G. P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., y Barkema, H. W. (2006a). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can.Vet.J.* **47**, 1089-1099.
- McKenna, S. L., VanLeeuwen, J. A., Barkema, H. W., Jansen, J. T., Hauer, G., Hendrick, S. H., Cote, G., Salsberg, E. B., y Empringham, R. E. (2006b). Proposed Canadian Voluntary National Johne's Disease Prevention and Control Program. *Can.Vet.J.* **47**, 539-541.
- McNab, W. B., Meek, A. H., Duncan, J. R., Brooks, B. W., Van Dreumel, A. A., Martín, S. W., Nielsen, K. H., Sugden, E. A., y Turcotte, C. (1991). An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can.J.Vet.Res.* **55**, 252-259.
- Meissner, G., Schroder, K. H., Amadio, G. E., Anz, W., Chaparas, S., Engel, H. W., Jenkins, P. A., Kappler, W., Kleeberg, H. H., Kubala, E., Kubin, M., Lauterbach, D., Lind, A., Magnusson, M., Mikova, Z., Pattyn, S. R., Schaefer, W. B., Stanford, J. L., Tsukamura, M., Wayne, L. G., Willers, I., y Wolinsky, E. (1974). A co-operative numerical analysis of nonscoto- and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J.Gen.Microbiol.* **83**, 207-235.
- Mendez, D., Gimenez, F., Escalona, A., Da, Mata O., González, A., Takiff, H., y de Waard, J. H. (2006). *Mycobacterium bovis* cultured from commercially pasteurized cows' milk: laboratory cross-contamination. *Vet.Microbiol.* **116**, 325-328.
- Merkal, R. S. y Curran, B. J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl.Microbiol.* **28**, 276-279.
- Merkal, R. S., KOPECKY, K. E., Larsen, A. B., y THURSTON, J. R. (1964). Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **25**, 1290-1294.
- Merkal, R. S. y Larsen, A. B. (1973). Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **34**, 27-28.
- Merkal, R. S. y McCulloch, W. G. (1882). A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr.Microbiol.* **7**, 333-335.
- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., Van der, Laan T., Rigouts, L., Portaels, F., y van Soolingen, D. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52**, 1505-1518.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., y Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**, 3446-3452.
- Miller, J. M., Jenny, A. L., y Ellingson, J. L. (1999). Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J.Vet.Diagn.Invest* **11**, 436-440.
- Miller, N., Infante, S., y Cleary, T. (2000). Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 1915-1919.
- Miller, R. V. y Kokjohn, T. A. (1990). General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. *Annu.Rev.Microbiol.* **44**, 365-394.

- Milner, A. R., Lepper, A. W., Symonds, W. N., y Gruner, E. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Res.Vet.Sci.* **42**, 140-144.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2007). Programa Nacional de erradicación de tuberculosis bovina presentado por España para los años 2008-2010. <http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/2008/TUBERCULOSIS/PROGRAMA%20NACIONAL%20DE%20ERRADICACIÓN%20DE%20TUBERCULOSIS%20BOVINA.%20AÑO%202008-2010.PDF>.
- Mobius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., y Kohler, H. (2008). Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **126**, 324-333.
- Mobius, P., Lentzsch, P., Moser, I., Naumann, L., Martín, G., y Kohler, H. (2006). Comparative macrorestriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig, and cattle. *Vet.Microbiol.* **117**, 284-291.
- Molina, A., Morera, L., y Llanes, D. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am.J.Vet.Res.* **52**, 863-868.
- Momotani, E., Whipple, D. L., Thiermann, A. B., y Cheville, N. F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet.Pathol.* **25**, 131-137.
- Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., y Quinn, P. J. (1994). The tuberculin test. *Vet.Microbiol.* **40**, 111-124.
- Moore, T. D., Allen, A. M., Ganaway, J. R., y Sevy, C. E. (1971). A fatal infection in the opossum due to *Mycobacterium intracellulare*. *J.Infect.Dis.* **123**, 569-578.
- Moravkova, M., Hlozek, P., Beran, V., Pavlik, I., Prezioso, S., Cuteri, V., y Bartos, M. (2007). Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res.Vet.Sci.*
- Morita, Y., Arai, M., Nomura, O., Maruyama, S., y Katsube, Y. (1994). Avian tuberculosis which occurred in an imported pigeon and pathogenicity of the isolates. *J.Vet.Med.Sci.* **56**, 585-587.
- Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Nagai, A., Kozawa, K., Kato, M., Nakajima, T., Mikami, T., Katsube, Y., y Kimura, H. (2004). Genetic diversity of the *dnaJ* gene in the *Mycobacterium avium* complex. *J.Med.Microbiol.* **53**, 813-817.
- Moss, M. T., Green, E. P., Tizard, M. L., Malik, Z. P., y Hermon-Taylor, J. (1991). Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut* **32**, 395-398.
- Moss, M. T., Malik, Z. P., Tizard, M. L., Green, E. P., Sanderson, J. D., y Hermon-Taylor, J. (1992a). IS902, an insertion element of the chronic-enteritis-causing *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *J.Gen.Microbiol.* **138** (Pt 1), 139-145.
- Moss, M. T., Sanderson, J. D., Tizard, M. L., Hermon-Taylor, J., el-Zaatari, F. A., Markesich, D. C., y Graham, D. Y. (1992b). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* **33**, 1209-1213.
- Motiwalla, A. S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E. J., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2004). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 1703-1712.
- Motiwalla, A. S., Li, L., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2006). Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes.Infect.* **8**, 1406-1418.
- Motiwalla, A. S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S. A., Stabel, J. R., Shulaw, W. P., Bannantine, J. P., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2003). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*:

- evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 2015-2026.
- Motiwalla, A. S., Strother, M., Theus, N. E., Stich, R. W., Byrum, B., Shulaw, W. P., Kapur, V., y Sreevatsan, S. (2005). Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 2111-2117.
- Mura, M., Bull, T. J., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., Pickup, R., y Hermon-Taylor, J. (2006). Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 854-859.
- Murcia, M. I., García, M. J., Otal, I., Gomez, A. B., y Menéndez, M. C. (2007). Molecular features of *Mycobacterium avium* human isolates carrying a single copy of IS1245 and IS1311 per genome. *FEMS Microbiol.Lett.* **272**, 229-237.
- Murcia, M. I., Tortoli, E., Menéndez, M. C., Palenque, E., y García, M. J. (2006). *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **56**, 2049-2054.
- Muskens, J., Barkema, H. W., Russchen, E., van, Maanen K., Schukken, Y. H., y Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet.Microbiol.* **77**, 253-261.
- Muskens, J., van Zijderveld, F., Eger, A., y Bakker, D. (2002). Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet.Microbiol.* **86**, 269-278.
- Nakase, H., Nishio, A., Tamaki, H., Matsuura, M., Asada, M., Chiba, T., y Okazaki, K. (2006). Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* **12**, 62-69.
- Naranjo, V., Gortázar, C., Vicente, J., y de la, Fuente J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet.Microbiol.* **127**, 1-9.
- Naser, S., Shafran, I., y El-Zaatari, F. (1999a). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's disease is serologically positive. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **6**, 282.
- Naser, S. A., Félix, J., Liping, H., Romero, C., Naser, N., Walsh, A., y Safraneck, W. (1999b). Occurrence of the IS900 gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients. *Mol.Cell Probes* **13**, 367-372.
- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., y Valentine, J. F. (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**, 1039-1044.
- Naser, S. A., Hultén, K., Shafran, I., Graham, D. Y., y el-Zaatari, F. A. (2000a). Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **77**, 497-504.
- Naser, S. A., Schwartz, D., y Shafran, I. (2000b). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am.J.Gastroenterol.* **95**, 1094-1095.
- Naughton, J. F., Mealey, K. L., Wardrop, K. J., Oaks, J. L., y Bradway, D. S. (2005). Systemic *Mycobacterium avium* infection in a dog diagnosed by polymerase chain reaction analysis of buffy coat. *J.Am.Anim Hosp.Assoc.* **41**, 128-132.
- Nebbia, P., Robino, P., Ferroglio, E., Rossi, L., Meneguz, G., y Rosati, S. (2000). Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the western Alps. *Vet.Res.Comm.* **24**, 435-443.
- Nel, E. E. (1981). *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovars isolated in South Africa from humans, swine, and the environment. *Rev.Infect.Dis.* **3**, 1013-1020.
- Nielsen, S. S. y Toft, N. (2007b). Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Prev.Vet.Med.* **81**, 306-317.

- Nielsen, S. S. y Toft, N. (2007a). Review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Nielsen, S. S. y Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet.Microbiol.*
- Nightingale, S. D., Byrd, L. T., Southern, P. M., Jockusch, J. D., Cal, S. X., y Wynne, B. A. (1992). Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J.Infect.Dis.* **165**, 1082-1085.
- Ninet, B., Monod, M., Emler, S., Pawlowski, J., Metral, C., Rohner, P., Auckenthaler, R., y Hirschel, B. (1996). Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J.Clin.Microbiol.* **34**, 2531-2536.
- Nishimori, K., Nakaoka, Y., Tachibana, S., Tanaka, K., Uchida, I., Nishimori, T., Saito, M., Hanyuu, H., Mori, Y., y Eguchi, M. (2007). Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates in Japan. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Novi, C., Rindi, L., Lari, N., y Garzelli, C. (2000). Molecular typing of *Mycobacterium avium* isolates by sequencing of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer and comparison with IS1245-based fingerprinting. *J Med.Microbiol.* **49**, 1091-1095.
- O'Brien, R., Mackintosh, C. G., Bakker, D., Kopečna, M., Pavlik, I., y Griffin, J. F. (2006). Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infect.Immun.* **74**, 3530-3537.
- O'Grady, D., Flynn, O., Costello, E., Quigley, F., Gogarty, A., McGuirk, J., O'Rourke, J., y Gibbons, N. (2000). Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* isolates from animal and human sources. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **4**, 278-281.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I. R., Donaghy, J., Rowe, M., y O'Mahony, P. (2004). Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 5138-5144.
- O'Shea, B., Khare, S., Bliss, K., Klein, P., Ficht, T. A., Adams, L. G., y Rice-Ficht, A. C. (2004). Amplified fragment length polymorphism reveals genomic variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 3600-3606.
- O'Toole, D., Tharp, S., Thomsen, B. V., Tan, E., y Payeur, J. B. (2005). Fatal mycobacteriosis with hepatosplenomegaly in a young dog due to *Mycobacterium avium*. *J.Vet.Diagn.Invest* **17**, 200-204.
- Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M., y Cvetnic, Z. (2003). Tuberculosis in cattle caused by IS901+*Mycobacterium avium* subsp. *avium* - a case report. *Vet.Med.(Praha)* **48**, 47-50.
- Odiambo, J. A., Borgdorff, M. W., Kiambih, F. M., Kibuga, D. K., Kwamanga, D. O., Ng'ang'a, L., Agwanda, R., Kalisvaart, N. A., Misljenovic, O., Nagelkerke, N. J., y Bosman, M. (1999). Tuberculosis and the HIV epidemic: increasing annual risk of tuberculous infection in Kenya, 1986-1996. *Am.J.Public Health* **89**, 1078-1082.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., y Mutharia, L. (2001). Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can.J.Vet.Res.* **65**, 201-205.
- Oliveira, R. S., Sircili, M. P., Oliveira, E. M., Balian, S. C., Ferreira-Neto, J. S., y Leao, S. C. (2003). Identification of *Mycobacterium avium* genotypes with distinctive traits by combination of IS1245-based restriction fragment length polymorphism and restriction analysis of *hsp65*. *J Clin.Microbiol.* **41**, 44-49.
- Oloya, J., Kazwala, R., Lund, A., Opuda-Asibo, J., Demelash, B., Skjerve, E., Johansen, T. B., y Djonne, B. (2007). Characterisation of mycobacteria isolated from slaughter cattle in pastoral regions of Uganda. *BMC.Microbiol.* **7**, 95.
- Olsen, I., Johansen, T. B., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S. F., y Djonne, B. (2004). A novel IS element, IS*Mpa1*, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **98**, 297-306.

- Olsen, I., Tryland, M., Wiker, H. G., y Reitan, L. J. (2001a). AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **8**, 797-801.
- Olsen, I., Wiker, H. G., Johnson, E., Langeeggen, H., y Reitan, L. J. (2001b). Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Scand.J.Immunol.* **53**, 198-203.
- Olsen, I., Wiker, H. G., Johnson, E., Langeeggen, H., y Reitan, L. J. (2003). Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against MPP14, a 14 kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Acta Vet.Scand.* **44**, 287.
- Ott, S. L., Wells, S. J., y Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev.Vet.Med.* **40**, 179-192.
- Overduin, P., Schouls, L., Roholl, P., van der, Zanden A., Mahmmoud, N., Herrewegh, A., y van Soolingen, D. (2004). Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 5022-5028.
- Paliwal, O. P. y Rajya, B. S. (1982). Evaluation of paratuberculosis in goats: pathomorphological studies. *Indian J.Vet.Path.* **6**, 29-34.
- Paolicchii, F. A., Cirone, K., Marsella, C., Gioffre, A., Cataldi, A., y Romano, M. (2006). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from commercial pasteurised milk. In 'Proc.8th.Int.Coll.Paratub.'. (E. J. Manning y S. S. Nielsen Eds.) Madison, WI, USA.)
- Paolicchii, F. A., Zumarraga, M. J., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., y Romano, M. (2003). Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **50**, 20-26.
- Park, K. T., Ahn, J., Davis, W. C., Koo, H. C., Kwon, N. H., Jung, W. K., Kim, J. M., Hong, S. K., y Park, Y. H. (2006). Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *J.Vet.Sci.* **7**, 349-354.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J. M., Hermoso de, Mendoza M., y Hermoso de, Mendoza J. (2003). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet.Microbiol.* **97**, 123-133.
- Paterson, A. B., Stuart, P., y Lesslie, I. W. (1958). The use of tests on slaughterhouse cattle for estimating relative potencies of tuberculin and for the calculation of discrimination tests. *J.Hyg.(Lond)* **56**, 1-18.
- Patton, E., Knust, B., Konkole, D., Bohn, J., y Wells, S. (2007). Johne's disease vaccination: a valuable tool in managing Johne's disease. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Paustian, M. L., Amonsin, A., Kapur, V., y Bannantine, J. P. (2004). Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 2675-2681.
- Paustian, M. L., Kapur, V., y Bannantine, J. P. (2005). Comparative genomic hybridizations reveal genetic regions within the *Mycobacterium avium* complex that are divergent from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J.Bacteriol.* **187**, 2406-2415.
- Paustian, M. L., Kapur, V., Sreevatsan, S., y Bannantine, J. P. (2007). Draft genome sequence of an ovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolate. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Pavlas, M. (1981). [Use of allergological diagnosis in the elimination of tuberculosis from poultry kept in a small flock]. *Vet.Med.(Praha)* **26**, 731-736.
- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du, Maine R., Machackova, M., Yayo, Ayele W., y Horvathova, A. (2000a). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet.Microbiol.* **77**, 231-251.

- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z., y Koskova, S. (1995). Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet.Microbiol.* **45**, 311-318.
- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du, Maine R., y Rychlik, I. (1999). Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J.Microbiol.Methods* **38**, 155-167.
- Pavlik, I., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P., Dvorska, L., y Whitlock, R. (2000b). Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet.Microbiol.* **77**, 309-324.
- Pavlik, I., Parmova, I., Lamka, J., Rozsypalova, Z., Beran, V., Tesinska, I., Kralik, P., y Kralova, A. (2007). Paratuberculosis control programme by faecal culture in cattle and other ruminants in the Czech Republic in the years 1992-2006. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., Dvorska, L., y Rychlik, I. (2000c). Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **7**, 212-217.
- Pearce, L. E., Truong, H. T., Crawford, R. A., Yates, G. F., Cavaignac, S., y de Lisle, G. W. (2001). Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **67**, 3964-3969.
- Pedrosa, J., Florido, M., Kunze, Z. M., Castro, A. G., Portaels, F., McFadden, J., Silva, M. T., y Appelberg, R. (1994). Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin.Exp.Immunol.* **98**, 210-216.
- Pérez, V., García Marín, J. F., y Badiola, J. J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J.Comp Pathol.* **114**, 107-122.
- Pestel-Caron, M. y Arbeit, R. D. (1998). Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. *J Clin.Microbiol.* **36**, 1859-1863.
- Pestel-Caron, M., Graff, G., Berthelot, G., Pons, J. L., y Lemeland, J. F. (1999). Molecular analysis of *Mycobacterium avium* isolates by using pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin.Microbiol.* **37**, 2450-2455.
- Pfaller, S. L., Aronson, T. W., Holtzman, A. E., y Covert, T. C. (2007). Amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates recovered from southern California. *J.Med.Microbiol.* **56**, 1152-1160.
- Picardeau, M., Prod'Hom, G., Raskine, L., LePennec, M. P., y Vincent, V. (1997a). Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 25-32.
- Picardeau, M., Varnerot, A., Lecompte, T., Brel, F., May, T., y Vincent, V. (1997b). Use of different molecular typing techniques for bacteriological follow-up in a clinical trial with AIDS patients with *Mycobacterium avium* bacteremia. *J Clin.Microbiol.* **35**, 2503-2510.
- Pickup, R. W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., Hurley, M., y Hermon-Taylor, J. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 2130-2139.
- Pickup, R. W., Rhodes, G., Bull, T. J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., y Hermon-Taylor, J. (2006). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 4067-4077.
- Pillai, S. R. y Jayarao, B. M. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *J.Dairy Sci.* **85**, 1052-1057.

- Pillai, S. R., Jayarao, B. M., Gummo, J. D., Hue, E. C., Tiwari, D., Stabel, J. R., y Whitlock, R. H. (2001). Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. *Vet.Microbiol.* **79**, 275-284.
- Pinedo, P. J., Buergelt, C. D., Wu, R., Donovan, G. A., Williams, J. E., Melendez, P. G., Morel, L., y Rae, D. O. (2007). Association between two polymorphisms in the bovine CARD12/NOD2 gene and paratuberculosis infection in Florida dairy and beef cattle. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Pitcock, J. A. y Gisler, D. B. (1961). Paratuberculosis (Johne's disease) in the monkey (*Macaca mulatta*). *Tech.Doc.Rep.SAMTDR.USAF.Sch Aersp.Med.* **61-86**, 1-4.
- Pollock, J. M. y Neill, S. D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet.J.* **163**, 115-127.
- Polymeros, D., Bogdanos, D. P., Day, R., Arioli, D., Vergani, D., y Forbes, A. (2006). Does cross-reactivity between *Mycobacterium avium paratuberculosis* and human intestinal antigens characterize Crohn's disease? *Gastroenterology* **131**, 85-96.
- Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., y Cocito, C. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 1601-1605.
- Power, S. B., Haagsma, J., y Smyth, D. P. (1993). Paratuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Ireland. *Vet.Rec.* **132**, 213-216.
- Primm, T. P., Lucero, C. A., y Falkinham, J. O., III (2004). Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin.Microbiol.Rev.* **17**, 98-106.
- Prodinger, W. M., Eigentler, A., Allerberger, F., Schonbauer, M., y Glawischnig, W. (2002). Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 2270-2272.
- Pryor, M., Springthorpe, S., Riffard, S., Brooks, T., Huo, Y., Davis, G., y Sattar, S. A. (2004). Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci.Technol.* **50**, 83-90.
- Quirke, P. (2001). Antagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* **49**, 757-760.
- Quist, C. F., Nettles, V. F., Manning, E. J., Hall, D. G., Gaydos, J. K., Wilmers, T. J., y Lopez, R. R. (2002). Paratuberculosis in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). *J.Wildl.Dis.* **38**, 729-737.
- Rademaker, J. L., Vissers, M. M., y Te Giffel, M. C. (2007). Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl.Environ.Microbiol.* **73**, 4185-4190.
- Radkowski, M., Uradzinski, J., y Szteyn, J. (1996). The occurrence of infectious and parasitic diseases in poultry slaughtered in the district of Olsztyn, Poland, 1986-91. *Avian Dis.* **40**, 285-289.
- Raizman, E. A. (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease: that's what epidemiology is all about. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Raizman, E. A., Wells, S. J., Godden, S. M., Bey, R. F., Oakes, M. J., Bentley, D. C., y Olsen, K. E. (2004). The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J.Dairy Sci.* **87**, 2959-2966.
- Raizman, E. A., Wells, S. J., Jordan, P. A., DelGiudice, G. D., y Bey, R. R. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can.J.Vet.Res.* **69**, 32-38.
- Rajya, B. S. y Singh, C. M. (1961). Studies on the pathology of Johne's disease in sheep. III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring infections. *Am.J.Vet.Res.* **22**, 189-203.

- Ramasoota, P., Chansiripornchai, N., Kallenius, G., Hoffner, S. E., y Svenson, S. B. (2001). Comparison of *Mycobacterium avium* complex (MAC) strains from pigs and humans in Sweden by random amplified polymorphic DNA (RAPD) using standardized reagents. *Vet.Microbiol.* **78**, 251-259.
- Rastogi, N., Goh, K. S., y Labrousse, V. (1992). Activity of clarithromycin compared with those of other drugs against *Mycobacterium paratuberculosis* and further enhancement of its extracellular and intracellular activities by ethambutol. *Antimicrob.Agents Chemother.* **36**, 2843-2846.
- Raviglione, M. C. (2003). The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis.(Edinb.)* **83**, 4-14.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., y Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet.Microbiol.* **115**, 77-90.
- Reddacliff, L. A., Beh, K., McGregor, H., y Whittington, R. J. (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust.Vet.J.* **83**, 435-441.
- Reed, G. B. (1957). Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). In 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'. (R. S. Breed, E. G. D. Murray, y N. R. Smith Eds.) The Williams and Wilkins Co.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B. J., Ninet, B., Hirschel, B., y Emler, S. (1998). 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J.Clin.Microbiol.* **36**, 1761-1764.
- Reviriego Gordejo, F. J. y Vermeersch, J. P. (2006). Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet.Microbiol.* **112**, 101-109.
- Reviriego, F. J., Moreno, M. A., y Domínguez, L. (2000). Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev.Vet.Med.* **43**, 43-51.
- Reyes-García, R., Pérez-de-la-Lastra JM, Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Garrido, J. M., y Gortázar, C. (2008). Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Vet.Immunol.Immunopathol.*
- Reynolds, D. (2006). A review of tuberculosis science and policy in Great Britain. *Vet.Microbiol.* **112**, 119-126.
- Richardson, G. D., Links, I. I., y Windsor, P. A. (2005). Gudair (OJD) vaccine self-inoculation: a case for early debridement. *Med.J.Aust.* **183**, 151-152.
- Richter, E., Wessling, J., Lugering, N., Domschke, W., y Rusch-Gerdes, S. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerg.Infect.Dis.* **8**, 729-731.
- Ridge, S. E. (1993). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples by using elements of the Roche MB Check system. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 400-405.
- Ridge, S. E., Harkin, J. T., Badman, R. T., Mellor, A. M., y Larsen, J. W. (1995). Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust.Vet.J.* **72**, 150-153.
- Riemann, H., Zaman, M. R., Ruppanner, R., Aalund, O., Jorgensen, J. B., Worsaae, H., y Behymer, D. (1979). Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **174**, 841-843.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., y Pierre-Audigier, C. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 852-857.
- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E. J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Rotter, J. I., Duerr, R. H., Cho, J. H., Daly, M. J., y Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat.Genet.*

- Ritacco, V., Kremer, K., Van der, Laan T., Pijnenburg, J. E., de Haas, P. E., y van Soolingen, D. (1998). Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.* **2**, 242-251.
- Robbe-Austerman, S., Gardner, I. A., Thomsen, B. V., Morrical, D. G., Martín, B. M., Palmer, M. V., Thoen, C. O., y Ewing, C. (2006a). Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet.Res.* **37**, 553-564.
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J. R., y Morrical, D. G. (2007). Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* organisms. *J.Vet.Diagn.Invest* **19**, 88-90.
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J. R., y Palmer, M. V. (2006b). Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J.Vet.Diagn.Invest* **18**, 189-194.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., y Bottger, E. C. (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **40**, 323-330.
- Roiz, M. P., Palenque, E., Guerrero, C., y García, M. J. (1995). Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing *Mycobacterium avium* strains. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 1389-1391.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J. F., y Naser, S. A. (2005). Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by *in situ* hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm.Bowel.Dis.* **11**, 116-125.
- Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W., y Mauch, H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J.Clin.Microbiol.* **36**, 139-147.
- Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., y Wood, P. R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust.Vet.J.* **67**, 134-137.
- Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., y Wood, P. R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust.Vet.J.* **69**, 1-4.
- Rowe, M. T. y Grant, I. R. (2006). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett.Appl.Microbiol.* **42**, 305-311.
- Ruiz, M., Rodríguez, J. C., Rodríguez-Valera, F., y Royo, G. (2003). Amplified-fragment length polymorphism as a complement to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **41**, 4820-4822.
- Ruiz, O., Manzano, C., Iriondo, M., Garrido, J., Juste, R. A., y Estonba, A. (2007). Genetic association study between bovine NRAMP1 and CARD15 genes & infection by M. a. paratuberculosis. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Runyon, E. H. (1967). *Micobacterium intracellulare*. *Am.Rev.Respir Dis.* **95**, 861-865.
- Ryan, P., Bennett, M. W., Aarons, S., Lee, G., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Connell, J., y Shanahan, F. (2002). PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut* **51**, 665-670.
- Ryan, P., Kelly, R. G., Lee, G., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Connell, J., y Shanahan, F. (2004). Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am.J.Gastroenterol.* **99**, 1539-1543.
- Ryan, T. J., Livingstone, P. G., Ramsey, D. S., de Lisle, G. W., Nugent, G., Collins, D. M., y Buddle, B. M. (2006). Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet.Microbiol.* **112**, 211-219.

- Saito, H., Tomioka, H., Sato, K., Tasaka, H., y Dawson, D. J. (1990). Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J.Clin.Microbiol.* **28**, 1694-1697.
- Salem, M., Zeid, A. A., Hassan, D., El-Sayed, A., y Zschoeck, M. (2005). Studies on Johne's disease in Egyptian cattle. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **52**, 134-137.
- Salgado, M. A., Herthnek, D., Kruze, J. D., Pradenas, M. V., y Bolske, G. (2007). Molecular typing of *Mycobacterium avium*, subsp. *paratuberculosis* strains from molecular different Chilean domestic and wildlife animal hosts. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Sanderson, J. D., Moss, M. T., Tizard, M. L., y Hermon-Taylor, J. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **33**, 890-896.
- Sanna, E., Woodall, C. J., Watt, N. J., Clarke, C. J., Pittau, M., Leoni, A., y Nieddu, A. M. (2000). *In situ*-PCR for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in paraffin-embedded tissues. *Eur.J.Histochem.* **44**, 179-184.
- Sartor, R. B. (2005). Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease? *Gut* **54**, 896-898.
- Sato, Y., Aoyagi, T., Matsuura, S., Fukui, S., Kitazawa, I., Nishimori, K., y Yokomizo, Y. (1996). An occurrence of avian tuberculosis in hooded merganser (*Lophodytes cucullatus*). *Avian Dis.* **40**, 941-944.
- Savine, E., Warren, R. M., van der Spuy, G. D., Beyers, N., van Helden, P. D., Loch, C., y Supply, P. (2002). Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 4561-4566.
- Saxegaard, F. (1985). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J.Clin.Microbiol.* **22**, 312-313.
- Saxegaard, F. y Baess, I. (1988). Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria". Determinations by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **96**, 37-42.
- Saxegaard, F., Baess, I., y Jantzen, E. (1988). Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *APMIS* **96**, 497-502.
- Scanu, A. M., Bull, T. J., Cannas, S., Sanderson, J. D., Sechi, L. A., Dettori, G., Zanetti, S., y Hermon-Taylor, J. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J.Clin.Microbiol.* **45**, 3883-3890.
- Schaad, U. B., Votteler, T. P., McCracken, G. H., Jr., y Nelson, J. D. (1979). Management of atypical mycobacterial lymphadenitis in childhood: a review based on 380 cases. *J.Pediatr.* **95**, 356-360.
- Schaefer, W. B. (1965). Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Am.Rev.Respir.Dis.* **92**, 85-93.
- Scheibl, P. y Gerlach, G. F. (1997). Differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates by rDNA-spacer analysis and random amplified polymorphic DNA patterns. *Vet.Microbiol.* **57**, 151-158.
- Schrenzel, M., Nicolas, M., Witte, C., Papendick, R., Tucker, T., Keener, L., Sutherland-Smith, M., Lamberski, N., Orndorff, D., Heckard, D., Witman, P., Mace, M., Rimlinger, D., Reed, S., y Rideout, B. (2008). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium intracellulare* in captive birds. *Vet.Microbiol.* **126**, 122-131.
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., y Naser, S. A. (2000). Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin.Microbiol.Infect.* **6**, 303-307.
- Scott, H. M., Fosgate, G. T., Libal, M. C., Sneed, L. W., Erol, E., Angulo, A. B., y Jordan, E. R. (2007a). Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-

- linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle. *Am.J.Vet.Res.* **68**, 236-245.
- Scott, H. M., Sorensen, O., Wu, J. T., Chow, E. Y., y Manninen, K. (2007b). Seroprevalence of and agroecological risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and neospora caninum infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada. *Can.Vet.J.* **48**, 397-406.
- Sechi, L. A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A., Solinas, A., Fadda, G., y Zanetti, S. (2001). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by *in situ* hybridization. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 4514-4517.
- Sechi, L. A., Paccagnini, D., Salza, S., Pacifico, A., Ahmed, N., y Zanetti, S. (2008). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteremia in type 1 diabetes mellitus: an infectious trigger? *Clin.Infect.Dis.* **46**, 148-149.
- Sechi, L. A., Rosu, V., Paccagnini, D., Salza, S., Pacifico, A., Ahmed, N., y Zanetti, S. (2007a). Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with type-1 diabetes, a possible trigger. *Proc. 9th. Int. Coll. Paratub.* **9**.
- Sechi, L. A., Rosu, V., Pacifico, A., Fadda, G., Ahmed, N., y Zanetti, S. (2007b). Humoral immune responses of Type-1 Diabetes patients to *M. avium* subspecies *paratuberculosis* lend support to the infectious trigger hypothesis. *Clin.Vaccine Immunol.*
- Sechi, L. A., Scanu, A. M., Mollicotti, P., Cannas, S., Mura, M., Dettori, G., Fadda, G., y Zanetti, S. (2005). Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am.J.Gastroenterol.* **100**, 1529-1536.
- Seitz, S. E., Heider, L. E., Heuston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., y Spangler, L. (1989). Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **194**, 1423-1426.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., y Hetzel, D. (2007). Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132**, 2313-2319.
- Selby, W. S. (2003). Current issues in Crohn's disease. *Med.J.Aust.* **178**, 532-533.
- Semret, M., Alexander, D. C., Turenne, C. Y., de Haas, P., Overduin, P., van Soolingen, D., Cousins, D., y Behr, M. A. (2005). Genomic polymorphisms for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* diagnostics. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 3704-3712.
- Semret, M., Bakker, D., Smart, N., Olsen, I., Haslov, K., y Behr, M. A. (2006a). Genetic analysis of *Mycobacterium avium* complex strains used for producing purified protein derivatives. *Clin.Vaccine Immunol.* **13**, 991-996.
- Semret, M., Turenne, C. Y., y Behr, M. A. (2006b). Insertion Sequence IS900 Revisited. *J.Clin.Microbiol.* **44**, 1081-1083.
- Semret, M., Turenne, C. Y., de Haas, P., Collins, D. M., y Behr, M. A. (2006c). Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J.Clin.Microbiol.* **44**, 881-887.
- Semret, M., Zhai, G., Mostowy, S., Cleto, C., Alexander, D., Cangelosi, G., Cousins, D., Collins, D. M., van Soolingen, D., y Behr, M. A. (2004). Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. *J.Bacteriol.* **186**, 6332-6334.
- Sergeant, E. S. (2001). Ovine Johne's disease in Australia--the first 20 years. *Aust.Vet.J.* **79**, 484-491.
- Sergeant, E. S. y Baldock, F. C. (2002). The estimated prevalence of Johne's disease infected sheep flocks in Australia. *Aust.Vet.J.* **80**, 762-768.
- Sergeant, E. S., Marshall, D. J., Eamens, G. J., Kearns, C., y Whittington, R. J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev.Vet.Med.* **61**, 235-248.

- Sergeant, E. S., Whittington, R. J., y More, S. J. (2002). Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Prev.Vet.Med.* **52**, 199-211.
- Sevilla, I. Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. 2007. Departamento de Sanidad Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario - Neiker - Tecnalia. Tesis Doctoral
- Sevilla, I., Adúriz, G., Garrido, J. M., Geijo, M. V., y Juste, R. A. (2003). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. In 'Proc.7th Int.Coll.Paratub.'. (R. A. Juste, M. V. Geijo, y J. M. Garrido Eds.) pp. 332-336. Madison, WI, USA.
- Sevilla, I., Garrido, J. M., Geijo, M., y Juste, R. A. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC.Microbiol.* **7**, 18.
- Sevilla, I., Singh, S. V., Garrido, J. M., Adúriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M. V., Whittington, R. J., Saunders, V., Whitlock, R. H., y Juste, R. A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev.Sci.Tech.* **24**, 1061-1066.
- Shafraan, I., Kugler, L., el-Zaatari, F. A., Naser, S. A., y Sandoval, J. (2002a). Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig.Liver Dis.* **34**, 22-28.
- Shafraan, I., Piromalli, C., Decker, J. W., Sandoval, J., Naser, S. A., y el-Zaatari, F. A. (2002b). Seroreactivities against *Saccharomyces cerevisiae* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* p35 and p36 antigens in Crohn's disease patients. *Dig.Dis.Sci.* **47**, 2079-2081.
- Shanahan, F. (2002). Crohn's disease. *Lancet* **359**, 62-69.
- Shanahan, F. y O'Mahony, J. (2005). The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am.J Gastroenterol.* **100**, 1537-1538.
- Shankar, H., Singh, S. V., Singh, P. K., Singh, A. V., y Sohal, J. S. (2007). Estimation of presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in un-pasteurized (individual and pooled milk) and commercial pasteurized milk and milk products in India and its characterization using culture, ELISA and PCR. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Sherman, D. M., Bray, B., Gay, J. M., y Bates, F. (1989). Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Am.J.Vet.Res.* **50**, 525-530.
- Sherman, D. M., Gay, J. M., Bouley, D. S., y Nelson, G. H. (1990). Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am.J.Vet.Res.* **51**, 461-465.
- Sherman, D. M., Markham, R. J., y Bates, F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **185**, 179-182.
- Shin, S. J. A new liquid -culture method, the TREK ESP Culture System II, for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. 2000. United States Animal Health Association. 2000 Committee Reports.
- Shin, S. J., Chang, Y. F., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H. S., Shin, K. S., Stehman, S., Shin, S. J., y Torres, A. (2004). Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *J.Vet.Diagn.Invest* **16**, 116-120.
- Shitaye, J. E., Matlova, L., Horvathova, A., Moravkova, M., Dvorska-Bartosova, L., Trembl, F., Lamka, J., y Pavlik, I. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *avium* distribution studied in a naturally infected hen flock and in the environment by culture, serotyping and IS901 RFLP methods. *Vet.Microbiol.* **127**, 155-164.
- Shulaw, W. P., Gordon, J. C., Bech-Nielsen, S., Pretzman, C. I., y Hoffsis, G. F. (1986). Evidence of paratuberculosis in Ohio's white-tailed deer, as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am.J.Vet.Res.* **47**, 2539-2542.
- Sibley, J. A., Woodbury, M. R., Appleyard, G. D., y Elkin, B. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J.Wildl.Dis.* **43**, 775-779.

- Singh, S. P., Salamon, H., Lahti, C. J., Farid-Moyer, M., y Small, P. M. (1999). Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1927-1931.
- Singh, S. V., Singh, A. V., Singh, P. K., y Sohal, J. S. (2008). Prevalence estimates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in animals, milk, milk-products and human beings in India. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Sivakumar, P., Tripathi, B. N., y Singh, N. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet.Microbiol.* **108**, 263-270.
- Slocombe, R. F. (1982). Combined Streptomycin-Isoniazid-Rifampin Therapy in the Treatment of Johne's Disease in a Goat. *Can.Vet.J.* **23**, 160-163.
- Smeed, J. A., Watkins, C. A., Rhind, S. M., y Hopkins, J. (2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC.Vet.Res.* **3**, 18.
- Socket, D. C., Conrad, T. A., Thomas, C. B., y Collins, M. T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 1134-1139.
- Soini, H., Bottger, E. C., y Viljanen, M. K. (1994). Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene. *J.Clin.Microbiol.* **32**, 2944-2947.
- Soini, H., Eerola, E., y Viljanen, M. K. (1996). Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex AccuProbe-positive isolates. *J.Clin.Microbiol.* **34**, 55-57.
- Soini, H., Skurnik, M., Liippo, K., Tala, E., y Viljanen, M. K. (1992). Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 2025-2028.
- Sorensen, O., Rawluk, S., Wu, J., Manninen, K., y Ollis, G. (2003). *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can.Vet.J.* **44**, 221-226.
- Spahr, U. y Schaefroth, K. (2001). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **67**, 4199-4205.
- Spangler, E., Heider, L. E., Bech-Nielsen, S., y Dorn, C. R. (1991). Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am.J.Vet.Res.* **52**, 1197-1200.
- Speer, C. A., Scott, M. C., Bannantine, J. P., Waters, W. R., Mori, Y., Whitlock, R. H., y Eda, S. (2006). A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin.Vaccine Immunol.* **13**, 535-540.
- St-Jean G. (1996). Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **12**, 417-430.
- St-Jean, G. y Jernigan, A. D. (1991). Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.* **7**, 793-804.
- Stabel, J. R. (2000a). Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *J.Dairy Sci.* **83**, 1659-1663.
- Stabel, J. R. (2000b). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **77**, 465-473.
- Stabel, J. R. (2001). On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J.Dairy Sci.* **84**, 524-527.
- Stabel, J. R. (1998). Johne's disease: a hidden threat. *J.Dairy Sci.* **81**, 283-288.
- Stabel, J. R. (1996). Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J.Vet.Diagn.Invest* **8**, 345-350.

- Stabel, J. R. y Bannantine, J. P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 4744-4750.
- Stabel, J. R., Kimura, K., y Robbe-Austerman, S. (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Vet.Diagn.Invest* **19**, 43-51.
- Stabel, J. R. y Lambertz, A. (2004). Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J.Food Prot.* **67**, 2719-2726.
- Stahl, D. A. y Urbance, J. W. (1990). The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J.Bacteriol.* **172**, 116-124.
- Stamp, J. T. y Watt, J. A. (1954). John's disease in sheep. *J.Comp Pathol.* **64**, 26-40.
- Stange, E. F., Travis, S. P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von, Herbay A., Warren, B. F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S. W., Scholmerich, J., y Reinisch, W. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55 Suppl 1**, i1-15.
- Steingrube, V. A., Gibson, J. L., Brown, B. A., Zhang, Y., Wilson, R. W., Rajagopalan, M., y Wallace, R. J., Jr. (1995). PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 149-153.
- Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., y Grant, I. R. (2007). Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J.Dairy Sci.* **90**, 3590-3595.
- Stevenson, K., Hughes, V. M., de Juan, L., Inglis, N. F., Wright, F., y Sharp, J. M. (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 1798-1804.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Goethe, R., Dohmann, K., Gerlach, G. F., Stevenson, K., Li, L. L., Zhang, Q., Kapur, V., y Bull, T. J. (2004). A 38-kilobase pathogenicity island specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* encodes cell surface proteins expressed in the host. *Infect.Immun.* **72**, 1265-1274.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., y Gerlach, G. F. (2002). Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J.Clin.Microbiol.* **40**, 4244-4250.
- Straus, D. y Ausubel, F. M. (1990). Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 1889-1893.
- Streeter, R. N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. P., y Rings, D. M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am.J.Vet.Res.* **56**, 1322-1324.
- Strommenger, B., Stevenson, K., y Gerlach, G. F. (2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol.Lett.* **196**, 31-37.
- Suffys, P. N., da Silva, Rocha A., de, Oliveira M., Campos, C. E., Barreto, A. M., Portaels, F., Rigouts, L., Wouters, G., Jannes, G., van, Reybroeck G., Mijs, W., y Vanderborght, B. (2001). Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 4477-4482.
- Sung, N. y Collins, M. T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**, 1334-1339.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., y Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol.Microbiol.* **26**, 991-1003.

- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., y Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol.Microbiol.* **36**, 762-771.
- Supply, P., Warren, R. M., Banuls, A. L., Lesjean, S., van der Spuy, G. D., Lewis, L. A., Tibayrenc, M., van Helden, P. D., y Locht, C. (2003). Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol.Microbiol.* **47**, 529-538.
- Swanson, D. S., Kapur, V., Stockbauer, K., Pan, X., Frothingham, R., y Musser, J. M. (1997). Subspecific differentiation of *Mycobacterium avium* complex strains by automated sequencing of a region of the gene (*hsp65*) encoding a 65-kilodalton heat shock protein. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**, 414-419.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **12**, 305-312.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., Spencer, P., Rosenberger, A. E., y Hutchinson, L. J. (1994). Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am.J.Vet.Res.* **55**, 905-909.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., y Spencer, P. A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J.Vet.Diagn.Invest* **7**, 488-493.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., McAdams, S., y Fyock, T. (2006). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J.Vet.Diagn.Invest* **18**, 2-6.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., y Rosenberger, A. E. (1992a). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am.J.Vet.Res.* **53**, 477-480.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., y Rosenberger, A. E. (1992b). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 166-171.
- Tafti, A. K. y Rashidi, K. (2000). The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health* **47**, 487-495.
- Takewaki, S., Okuzumi, K., Ishiko, H., Nakahara, K., Ohkubo, A., y Nagai, R. (1993). Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 446-450.
- Tasara, T., Hoelzle, L. E., y Stephan, R. (2005). Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int.J.Food Microbiol.* **104**, 279-287.
- Tasara, T. y Stephan, R. (2005). Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 5957-5968.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K., y Bodmer, T. (1993a). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**, 647-650.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., y Bodmer, T. (1993b). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 175-178.
- Tell, L. A., Woods, L., y Cromie, R. L. (2001). Mycobacteriosis in birds. *Rev.Sci.Tech.* **20**, 180-203.
- Temple, R. M., Muscoplat, C. C., Thoen, C. O., Himes, E. M., y Johnson, D. W. (1979). Observations on diagnostic tests for paratuberculosis in a deer herd. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **175**, 914-915.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 2233-2239.
- Thegerstrom, J., Marklund, B. I., Hoffner, S., Axelsson-Olsson, D., Kauppinen, J., y Olsen, B. (2005). *Mycobacterium avium* with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely in humans. *Scand.J Infect.Dis.* **37**, 15-20.

- Thibault, V. C., Grayon, M., Boschirolì, M. L., Hubbans, C., Overduin, P., Stevenson, K., Gutiérrez, M. C., Supply, P., y Biet, F. (2007). New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J.Clin.Microbiol.* **45**, 2404-2410.
- Thoen, C., Lobue, P., y de, Kantor, I (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet.Microbiol.* **112**, 339-345.
- Thom, M. L., Hope, J. C., McAulay, M., Villarreal-Ramos, B., Coffey, T. J., Stephens, S., Vordermeier, H. M., y Howard, C. J. (2006). The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **114**, 25-36.
- Thompson, B. R., Clark, R. G., y Mackintosh, C. G. (2007). Intra-uterine transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically affected red deer (*Cervus elaphus*). *N.Z.Vet.J.* **55**, 308-313.
- Thompson, P. J., Cousins, D. V., Gow, B. L., Collins, D. M., Williamson, B. H., y Dagnia, H. T. (1993). Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am.Rev.Respir.Dis.* **147**, 164-167.
- Thorel, M. F. (1984). Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann.Rech.Vet.* **15**, 405-409.
- Thorel, M. F., Huchzermeyer, H., Weiss, R., y Fontaine, J. J. (1997). *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet.Res.* **28**, 439-447.
- Thorel, M. F., Huchzermeyer, H. F., y Michel, A. L. (2001). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev.Sci.Tech.* **20**, 204-218.
- Thorel, M. F., Krichevsky, M., y Levy-Frebault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **40**, 254-260.
- Tirkkonen, T., Pakarinen, J., Moisander, A. M., Makinen, J., Soini, H., y Li-Vehmas, T. (2007). High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis. *Vet.Microbiol.* **125**, 175-181.
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L., Keefe, G. P., y Barkema, H. W. (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can.Vet.J.* **47**, 874-882.
- Tizard, M., Bull, T., Millar, D., Doran, T., Martín, H., Sumar, N., Ford, J., y Hermon-Taylor, J. (1998). A low G+C content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **144** (Pt 12), 3413-3423.
- Tizard, M. L., Moss, M. T., Sanderson, J. D., Austen, B. M., y Hermon-Taylor, J. (1992). p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Gen.Microbiol.* **138 Pt 8**, 1729-1736.
- Tobin-D'Angelo, M. J., Blass, M. A., del Rio, C., Halvosa, J. S., Blumberg, H. M., y Horsburgh, C. R., Jr. (2004). Hospital water as a source of *Mycobacterium avium* complex isolates in respiratory specimens. *J Infect.Dis.* **189**, 98-104.
- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin.Microbiol.Rev.* **16**, 319-354.
- Tortoli, E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **48**, 159-178.
- Tortoli, E., Rindi, L., García, M. J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R. M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M. I., Nanetti, A., Piccoli, P., y Scarparo, C. (2004). Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **54**, 1277-1285.

- Travis, S. P., Stange, E. F., Lemann, M., Oresland, T., Chowers, Y., Forbes, A., D'Haens, G., Kitis, G., Cortot, A., Prantera, C., Marteau, P., Colombel, J. F., Gionchetti, P., Bouhnik, Y., Turet, E., Kroesen, J., Starlinger, M., y Mortensen, N. J. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55 Suppl 1**, i16-i35.
- Tryland, M., Olsen, I., Vikoren, T., Handeland, K., Arnemo, J. M., Tharaldsen, J., Djonne, B., Josefsen, T. D., y Reitan, L. J. (2004). Serologic survey for antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in free-ranging cervids from Norway. *J.Wildl.Dis.* **40**, 32-41.
- Turenne, C. Y., Semret, M., Cousins, D. V., Collins, D. M., y Behr, M. A. (2006). Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J.Clin.Microbiol.* **44**, 433-440.
- Turenne, C. Y., Tschetter, L., Wolfe, J., y Kabani, A. (2001). Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 3637-3648.
- Turenne, C. Y., Wallace, R., Jr., y Behr, M. A. (2007). *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**, 205-229.
- Tutor-Ureta, P., Mellor-Pita, S., Yebra-Bango, M., y Vargas, J. A. (2006). [Middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection: the Lady Windermere syndrome]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* **24**, 590-591.
- Twort, F. W. y Ingram, G. L. Y. (1912). A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johnes, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proc.R.Soc.Lond., B, Biol.Sci.* **84**, 517-542.
- Tzen, C. Y., Wu, T. Y., y Tzen, C. Y. (2006). Detection of mycobacteria in Crohn's disease by a broad spectrum polymerase chain reaction. *J.Formos.Med.Assoc.* **105**, 290-298.
- Uzoigwe, J. C., Khaitisa, M. L., y Gibbs, P. S. (2007). Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol.Infect.* **135**, 1057-1068.
- Vaerewijck, M. J., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J., y Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol.Rev.* **29**, 911-934.
- Vallée, H. y Rinjard, P. (2008). Etudes sur l'entérite paratuberculeuse des bovidés. *Revue Générale de Médecine Vétérinaire* **409**, 1-9.
- van Belkum A. (1999). Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. *Cell.Mol.Life Sci.* **56**, 729-734.
- van Kooten, H. C., Mackintosh, C. G., y Koets, A. P. (2006). Intra-uterine transmission of paratuberculosis (Johnes' disease) in farmed red deer. *N.Z.Vet.J.* **54**, 16-20.
- van Schaik G., Kalis, C. H., Benedictus, G., Dijkhuizen, A. A., y Huirne, R. B. (1996). Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet.Rec.* **139**, 624-627.
- van Soolingen, D., Bauer, J., Ritacco, V., Leao, S. C., Pavlik, I., Vincent, V., Rastogi, N., Gori, A., Bodmer, T., Garzelli, C., y García, M. J. (1998). IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J.Clin.Microbiol.* **36**, 3051-3054.
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L. M., y Van Embden, J. D. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**, 1236-1245.
- van Weering H., van, Schaik G., van der, Meulen A., Waal, M., Franken, P., y van, Maanen K. (2007). Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Vet.Microbiol.* **125**, 49-58.

- VanLeeuwen, J. A., Forsythe, L., Tiwari, A., y Chartier, R. (2005). Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can.Vet.J.* **46**, 56-58.
- VanLeeuwen, J. A., Tiwari, A., Plaizier, J. C., y Whiting, T. L. (2006). Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can.Vet.J.* **47**, 783-786.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., y Portaels, F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.* **100**, 197-204.
- Vansnick, E., de Rijk P., Vercammen, F., Rigouts, L., Portaels, F., y Geysen, D. (2007). A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. *Vet.Microbiol.* **122**, 166-171.
- Varges, R., Marassi, C. D., Oelemann, W. M. R., y Lilenbaum, W. (2007). Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E., Hermon-Taylor, J., y McFadden, J. J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J.Clin.Microbiol.* **28**, 933-937.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., y Gortázar, C. (2007). Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Vet.Res.* **38**, 451-464.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J. M., Fernández-de-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., y Gortázar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet.Res.* **37**, 107-119.
- Viljanen, M. K., Olkkonen, L., y Katila, M. L. (1993). Conventional identification characteristics, mycolate and fatty acid composition, and clinical significance of MAIX AccuProbe-positive isolates of *Mycobacterium avium* complex. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 1376-1378.
- Vogiatzakis, E., Stefanou, S., Skroubelou, A., Anagnostou, S., Marínis, E., y Matsiota-Bernard, P. (1998). Molecular markers for the investigation of *Mycobacterium gordonae* epidemics. *J.Hosp.Infect.* **38**, 217-222.
- Von Reyn, C. F., Maslow, J. N., Barber, T. W., Falkinham, J. O., III, y Arbeit, R. D. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* **343**, 1137-1141.
- Vordermeier, M., Aranaz, A., y Pollock, J. M. (2001). Immunodiagnosis of bovine tuberculosis. Summary of a satellite workshop of the *Mycobacterium bovis* 2000 conference, Cambridge, UK, 17 August 2000. *Tuberculosis.(Edinb.)* **81**, 177-180.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., y . (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.
- Wagner, J. C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., y Levisseur, S. (1958). An acid-fast bacillus isolated from the lungs of a cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallus). *Nature* **181**, 284-285.
- Wallace, R. J., Jr., Zhang, Y., Brown, B. A., Fraser, V., Mazurek, G. H., y Maloney, S. (1993). DNA large restriction fragment patterns of sporadic and epidemic nosocomial strains of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 2697-2701.
- Walravens, K., Marche, S., Rosseels, V., Wellemans, V., Boelaert, F., Huygen, K., y Godfroid, J. (2002). IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **87**, 401-406.
- Ward, M. P. y Pérez, A. M. (2004). Association between soil type and paratuberculosis in cattle herds. *Am.J.Vet.Res.* **65**, 10-14.

- Waters, W. R., Miller, J. M., Palmer, M. V., Stabel, J. R., Jones, D. E., Koistinen, K. A., Steadham, E. M., Hamilton, M. J., Davis, W. C., y Bannantine, J. P. (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect.Immun.* **71**, 5130-5138.
- Waters, W. R., Nonnecke, B. J., Palmer, M. V., Robbe-Austermann, S., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Whipple, D. L., Payeur, J. B., Estes, D. M., Pitzer, J. E., y Minion, F. C. (2004). Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **11**, 729-735.
- Wayne, L. G., Good, R. C., Tsang, A., Butler, R., Dawson, D., Groothuis, D., Gross, W., Hawkins, J., Kilburn, J., Kubin, M., y . (1993). Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43**, 482-489.
- Wayne, L. G. y Sramek, H. A. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* **5**, 1-25.
- Weber, M. F., van Schaik, G., y van Weering, H. (2007). Results of the Dutch bulk milk quality assurance programme for paratuberculosis. *Proc.9th.Int.Coll.Paratub.* **9**.
- Weiss, D. J., Evanson, O. A., Moritz, A., Deng, M. Q., y Abrahamsen, M. S. (2002). Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect.Immun.* **70**, 5556-5561.
- Wells, S. J. y Wagner, B. A. (2000b). Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **216**, 1450-1457.
- Wells, S. J. y Wagner, B. A. (2000a). Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **216**, 1450-1457.
- Wells, S. J., Whitlock, R. H., Lindeman, C. J., y Fyock, T. (2002). Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.* **63**, 1207-1211.
- Wentink, G. H., Bongers, J. H., Zeeuwen, A. A., y Jaartsveld, F. H. (1994). Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl.Veterinarmed.B* **41**, 517-522.
- Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., y Rowe, M. T. (2005). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 7107-7112.
- Whan, L., Grant, I. R., y Rowe, M. T. (2006). Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC.Microbiol.* **6**, 63.
- Whan, L. B., Grant, I. R., Ball, H. J., Scott, R., y Rowe, M. T. (2001). Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett.Appl.Microbiol.* **33**, 227-231.
- Whipple, D., Kapke, P., y Vary, C. (1990). Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **28**, 2561-2564.
- Whitlock, R. H. y Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.* **12**, 345-356.
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., y Van, Tiem J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet.Microbiol.* **77**, 387-398.
- Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., y Cousins, D. (1998). Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol.Cell Probes* **12**, 349-358.

- Whittington, R. J., Eamens, G. J., y Cousins, D. V. (2003a). Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust.Vet.J.* **81**, 71-75.
- Whittington, R. J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C. A., Marshall, D. J., y Links, I. J. (2000a). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 2550-2556.
- Whittington, R. J., Hope, A. F., Marshall, D. J., Taragel, C. A., y Marsh, I. (2000b). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 3240-3248.
- Whittington, R. J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M. J., Marshall, D. J., y Fraser, C. A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 1077-1083.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., y Reddacliff, L. A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 5304-5308.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., Taylor, P. J., Marshall, D. J., Taragel, C., y Reddacliff, L. A. (2003b). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust.Vet.J.* **81**, 559-563.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., y Whitlock, R. H. (2001a). Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol.Cell Probes* **15**, 139-145.
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., y Reddacliff, L. A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 2989-3004.
- Whittington, R. J. y Sergeant, E. S. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust.Vet.J.* **79**, 267-278.
- Whittington, R. J., Taragel, C. A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., y Fridriksdottir, V. (2001b). Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet.Microbiol.* **79**, 311-322.
- Whittington, R. J. y Windsor, P. A. (2007). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet.J.*
- WHO. TB, a global emergency, WHO report on the TB epidemic. 1994. http://whqlibdoc.who.int/hq/1994/WHO_TB_94.177.pdf.
- Williams, E. S., Snyder, S. P., y Martín, K. L. (1983). Experimental infection of some North American wild ruminants and domestic sheep with *Mycobacterium paratuberculosis*: clinical and bacteriological findings. *J.Wildl.Dis.* **19**, 185-191.
- Williams, E. S., Spraker, T. R., y Schoonveld, G. G. (1979). Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a Rocky Mountain goat in Colorado. *J.Wildl.Dis.* **15**, 221-227.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Williams, S. L., Harris, N. B., y Barletta, R. G. (1999). Development of a firefly luciferase-based assay for determining antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **37**, 304-309.
- Windsor, P. A., Bush, R., Links, I., y Epplenston, J. (2005). Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust.Vet.J.* **83**, 216-220.

- Windsor, P. A. y Eppleston, J. (2006). Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N.Z.Vet.J.* **54**, 237-241.
- Wolinsky, E. (1979). Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am.Rev.Respir.Dis.* **119**, 107-159.
- Wood, P. R., Corner, L. A., y Plackett, P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res.Vet.Sci.* **49**, 46-49.
- Wood, P. R., Corner, L. A., Rothel, J. S., Baldock, C., Jones, S. L., Cousins, D. B., McCormick, B. S., Francis, B. R., Creeper, J., y Tweddle, N. E. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust.Vet.J.* **68**, 286-290.
- Wu, C. W., Glasner, J., Collins, M., Naser, S., y Talaat, A. M. (2006). Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. *J.Bacteriol.* **188**, 711-723.
- Yamamoto, S. y Harayama, S. (1996). Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46**, 506-511.
- Zakowski, P., Fligel, S., Berlin, G. W., y Johnson, L., Jr. (1982). Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**, 2980-2982.
- Zanetti, S., Molicotti, P., Cannas, S., Ortu, S., Ahmed, N., y Sechi, L. A. (2006). "In vitro" activities of antimycobacterial agents against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* linked to Crohn's disease and paratuberculosis. *Ann.Clin.Microbiol.Antimicrob.* **5**, 27.
- Zelazny, A. M., Calhoun, L. B., Li, L., Shea, Y. R., y Fischer, S. H. (2005). Identification of *Mycobacterium* species by *secA1* sequences. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 1051-1058.
- Zhang, Y., Mann, L. B., Wilson, R. W., Brown-Elliott, B. A., Vincent, V., Iinuma, Y., y Wallace, R. J., Jr. (2004). Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 119-125.
- Zhang, Y., Mazurek, G. H., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Pang, Y., Murphy, D. T., y Wallace, R. J., Jr. (1992). DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J.Clin.Microbiol.* **30**, 1551-1556.
- Zhang, Y., Rajagopalan, M., Brown, B. A., y Wallace, R. J., Jr. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J.Clin.Microbiol.* **35**, 3132-3139.
- Zhao, B. Y., Czuprynski, C. J., y Collins, M. T. (1999). Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a radiometric method. *Can.J.Vet.Res.* **63**, 56-61.
- Zolg, J. W. y Philippi-Schulz, S. (1994). The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J.Clin.Microbiol.* **32**, 2801-2812.
- Zwick, L. S., Walsh, T. F., Barbiers, R., Collins, M. T., Kinsel, M. J., y Murnane, R. D. (2002). Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J.Vet.Diagn.Invest* **14**, 326-328.